

**ABNORMALITAS KROMOSOM Y
PADA PENDERITA AMBIGUS GENITALIA**

***Y CHROMOSOME ABNORMALITY
IN PATIENTS WITH AMBIGUOUS GENITALIA***



**Tesis
Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Siti Wasilah
G4A006014**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

TESIS
ABNORMALITAS KROMOSOM Y
PADA PENDERITA AMBIGUS GENITALIA

disusun oleh :

Siti Wasilah
G4A006014

Telah dipertahankan di depan tim penguji
pada tanggal 30 Desember 2008
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama,

Pembimbing Kedua,

Dr. Tri Indah Winarni, MSi.Med
NIP. 132 163 892

dr. Rudy Susanto SpA(K)
NIP. 140 078 567

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

DR. Dr. Winarto, SpMK.SpM
NIP. 130 675 157

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Desember 2008

Siti Wasilah

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Siti Wasilah
Tempat/tanggal lahir : Martapura, 30 April 1977
Agama : Islam
Jenis kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri Keraton II Martapura : lulus tahun 1989
2. SMP Negeri 1 Martapura : lulus tahun 1992
3. SMA Negeri Martapura : lulus tahun 1995
4. FK Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin : lulus tahun 2003
5. Magister Ilmu Biomedik UNDIP : 2007-sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

Tahun 2003-2004 : Dokter Puskesmas Aranio Kab. Banjar Kalsel
Tahun 2005-sekarang : Staf pengajar bagian Biologi FK Universitas
Lambung Mangkurat Kalimantan Selatan

D. Penelitian dan Publikasi Lokal

1. Aktivitas katalase dan konsentrasi peroksida plasma total pada pria muda sehat yang melakukan puasa ramadhan. Publikasi dalam Berkala Kedokteran FK Universitas Lambung Mangkurat, 2006;3(2)
2. Gambaran dermatoglifi pada penderita retardasi mental di SLB C Banjarbaru dan Martapura. Belum dipublikasikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya kami dapat menyelesaikan tesis ini untuk memenuhi sebagian persyaratan dalam menyelesaikan Program Magister Ilmu Biomedik di Universitas Diponegoro.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami menghaturkan rasa terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan dukungan pembiayaan melalui Program Beasiswa Unggulan hingga penyelesaian tesis berdasarkan DIPA Sekretariat Jenderal DEPDIKNAS Tahun Anggaran 2007 sampai dengan Tahun 2008
2. Rektor Universitas Diponegoro yang memberi kesempatan kepada kami untuk meningkatkan ilmu pengetahuan.
3. Dr. dr. Winarto, SpMK, SpM selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca sarjana Universitas Diponegoro Semarang, beserta jajarannya dan Prof. dr. H. Soebowo, SpPA (K) selaku mantan Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca sarjana Universitas Diponegoro Semarang beserta jajarannya atas bimbingan dan sarannya dalam penyusunan proposal penelitian dan tesis ini
4. Prof. Dr. Sultana MH Faradz, PhD, selaku Ketua Konsentrasi Konseling Genetika Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP, sekaligus selaku Direktur Utama CEBIOR yang telah memberikan

kesempatan kepada kami untuk meningkatkan ilmu pengetahuan, juga berkenan meluangkan waktu memberikan perhatian, tenaga dan pikiran untuk memberi bimbingan, dorongan, semangat dan arahan, berbagi ilmu dan pengalaman kepada kami, serta memberikan contoh berharga tentang dedikasi pada ilmu yang tiada henti di antara berbagai kesibukan beliau yang sangat padat agar kami dapat menyelesaikan studi dan menyusun laporan penelitian ini.

5. dr. Tri Indah Winarni, MSi.Med selaku pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu memberikan perhatian, tenaga dan pikiran untuk memberi bimbingan dan arahan yang tiada henti di antara berbagai kesibukan beliau yang sangat padat agar kami dapat menyelesaikan studi dan menyusun laporan penelitian ini.
6. dr. Rudy Susanto,SpA(K), selaku pembimbing yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberi bimbingan, dorongan dan arahan di sela-sela kesibukan beliau yang sangat padat agar kami dapat menyelesaikan dan menyusun laporan penelitian ini dengan baik.
7. Prof. DR. Dr. Suharyo Hadisaputro, SpPD-KPTI; Dr. Asri Purwanti, SpA.,M.Pd; dan dr. Achmad Zulfa Juniarto, MSi.Med, Sp.And, selaku penguji yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberi masukan dan arahan mulai dari penyusunan proposal hingga perbaikan penyusunan laporan penelitian ini.
8. Prof. SH Yeo, Prof. Ivy Ng, Angeline Lai,MD, Tan Ee Shien,MD, Breanna Cham, Louis Knight,MD,PhD, Cheong Kum-Fong dan seluruh staf

laboratorium sitogenetik, Law See Huen MD dan seluruh staf laboratorium DNA KK *Hospital* Singapura, atas kesempatan menuntut ilmu dan pengalaman dalam konseling genetika dan teknik laboratorium sitogenetika.

9. Guru-guru kami di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Konseling Genetika, atas segala bimbingan yang telah diberikan.
10. Bapak H. Jamhari HS dan Ibu Hj. Gusti Aminah (Alm), orang tuaku tercinta yang dengan penuh kasih sayang, cinta dan pengorbanan telah mengasuh, membesarkan, mendidik dan menanamkan rasa disiplin serta tanggung jawab, memberikan dorongan dan semangat, bantuan moriil maupun materiil; sujud, bakti, dan cinta kami haturkan dengan segenap rasa tulus hati.
11. Bapak H. Panderi dan Ibu Hj. Safrah, mertuaku tercinta yang dengan penuh kasih sayang memberikan kepercayaan, perhatian, pengertian, dorongan dan semangat, sujud bakti kami haturkan dengan tulus hati.
12. Suamiku tercinta Ibnu Sina,SPi, yang memberikan kesempatan, kepercayaan, dorongan dan semangat. Terima kasih untuk kesabaran, kesetiaan dan ketabahan mendampingi dalam suka dan duka hingga masa 2 tahun ini terlewati.
13. Anak-anakku tercinta, Jundi Muhammad, prajuritku yang telah menjadi dewasa dalam usia kekanakanmu yang selalu membuat ummi bersemangat; Syarif Hidayatullah si penyejuk hati, kelembutanmu selalu menentramkan ummi; dan Muhammad Al Fatih yang menyulut semangat jiwa ummi. Untukmu bertiga, segenap cinta ummi dan terima kasih karena mau berbagi

waktu, juga atas kesabaran dan kemampuan belajar cepat yang kalian tunjukkan. Hari-hari esok semestinya adalah waktu-waktu terbaik untuk kebersamaan kita.

14. Kakak-kakakku tersayang, Dra. Noor Hikmah, MSi, Drs. Fathurrahman, M.Yahya, SSi.Apt, M. Helfiannoor, MSi, dan adikku M. Jazuli, Amd yang dengan penuh kasih sayang dan perhatian memberikan dorongan semangat dan doa.
15. Teman-teman angkatan I Program Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Konseling Genetika tahun 2007 atas dukungan, bantuan, kerjasama dan persahabatan selama menempuh pendidikan.
16. Mba Wiwik, Mbak Rita, Mbak nanik, Mbak Lusi, Mbak Dina, Mas Taufik, Pak Joko, Staf Pusat Riset Biomedik FK UNDIP atas dukungan, bantuan, kerjasama dan persahabatan yang tulus.
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu kami menyelesaikan penelitian dan laporan ini.

Akhirnya, di atas segalanya sekali lagi rasa syukur kami kepada Allah SWT, semoga penelitian ini bermanfaat, dan semoga Allah SWT memberkahi apa yang kami lakukan.

Semarang, Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|-------------------------------|---------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN | ii |
| HALAMAN PERNYATAN | iii |
| RIWAYAT HIDUP | iv |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | v |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR SINGKATAN | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR BAGAN..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xv |
| ABSTRAK..... | xvi |
| <i>ABSTRACT</i> | xvii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Keaslian Penelitian..... | 3 |
| 1.4. Manfaat Penelitian | 5 |
| 1.5. Tujuan Penelitian | 5 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 7 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Kromosom Y | 7 |
| 2.2. Kromosom Y dan Perkembangan Seksual Normal | 9 |
| 2.3 Ambigus Genitalia | 12 |
| 2.4 Abnormalitas Kromosom Y dan Ambigus Genitalia..... | 15 |
| 2.5. Kerangka Teori Dan Kerangka Konsep..... | 19 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 23 |
| 3.1 Desain Penelitian | 23 |
| 3.2 Populasi, Sampel dan Kontrol | 23 |
| 3.3 Variabel Penelitian..... | 26 |
| 3.4 Definisi operasional, Pengukuran dan Skala Ukur | 26 |
| 3.5 Alat dan Bahan Penelitian..... | 29 |
| 3.6 Cara Penelitian | 29 |
| 3.7 Analisis Data..... | 32 |
| 3.8 Etika Penelitian | 33 |
| BAB 4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN..... | 34 |
| 4.1 Hasil Penelitian | 34 |
| 4.2 Pembahasan..... | 43 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 54 |
| 5.1 Kesimpulan | 54 |
| 5.2 Saran | 54 |
| BAB 6. RINGKASAN..... | 56 |
| DAFTAR PUSTAKA | 67 |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|------|--|
| bp | : base pair, sejumlah pasangan basa yang digunakan untuk menyatakan ukuran suatu gen |
| dup | : duplikasi |
| idic | : isodisentrik |
| kbp | : kilo base pair |
| Mb | : mega base pair |
| p | : petit, lengan pendek kromosom |
| q | : lengan panjang kromosom |
| Yp | : lengan pendek kromosom Y |
| Yq | : lengan panjang kromosom Y |
| Yqh | : regio heterokromatin lengan panjang kromosom Y |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Judul | Halaman |
|-------|--|---------|
| 1 | Daftar penelitian mengenai profil sitogenetik penderita ambigu genitalia | 4 |
| 2 | Klasifikasi ambigu genitalia berdasarkan penyebabnya | 13 |
| 3 | Level variasi <i>C-bands</i> menurut Patil dan Lubs | 19 |
| 4 | Karakteristik fisik genitalia eksterna sampel penelitian | 35 |
| 5 | Distribusi karakteristik sampel berdasarkan derajat hipospadia | 36 |
| 6 | Distribusi karakteristik sampel berdasarkan lokasi gonad | 36 |
| 7 | Distribusi karakteristik klinis subyek berdasarkan <i>Quigley stage</i> | 36 |
| 8 | Panjang rata-rata kromosom Y pada sampel dan kontrol | 40 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Judul | Halaman |
|--------|---|---------|
| 1 | Idiogram kromosom Y yang memperlihatkan regio eukromatin dan heterokromatin | 8 |
| 2 | Struktur genomik kromosom Y pada manusia | 8 |
| 3 | Bagan tahapan-tahapan diferensiasi seksual | 9 |
| 4 | <i>Quigley stage</i> | 29 |
| 5 | <i>Pedigree</i> subyek dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y | 37 |
| 6 | <i>Pedigree</i> kontrol dengan kariotip 46,XY/47,XXY (12%) | 39 |
| 7 | Hasil tes statistik perbedaan panjang kromosom Y antara subyek dan kontrol penelitian | 41 |
| 8 | Kromosom Y dengan aberasi struktur (dari metafase dengan teknik pewarnaan <i>G-banding</i>) dan idiogram kromosom Y normal | 42 |
| 9 | Aberasi struktur kromosom Y pada metafase dengan pewarnaan <i>C- Banding</i> | 43 |

DAFTAR BAGAN

| Bagan | Judul | Halaman |
|-------|---|---------|
| 1 | Pengaruh kromosom Y pada diferensiasi gonad | 11 |
| 2 | Kerangka Teori | 21 |
| 3 | Kerangka Konsep | 22 |
| 4 | Alur Penelitian | 32 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Judul | Halaman |
|----------|--|---------|
| 1 | Prosedur Pemeriksaan Sitogenetik | 1 |
| 2 | Hasil <i>Preliminary Study</i> Panjang Kromosom Y pada 20 orang laki-laki bukan penderita ambigu genitalia | 4 |
| 3 | Hasil tes statistik perbedaan panjang kromosom Y antara subyek dan kontrol penelitian | 5 |
| 4 | Gambar contoh metafase yang memenuhi kriteria <i>banding level 550</i> | 7 |
| 5 | <i>Ethical Clearance</i> | 8 |
| 6 | <i>Informed consent</i> | 9 |

Abstrak

Latar belakang. Ambigus genitalia adalah suatu kelainan yang ditandai dengan adanya organ genitalia eksterna yang tidak jelas laki-laki atau perempuan, atau mempunyai gambaran kedua jenis kelamin. Kelainan ini masih belum banyak diteliti di Indonesia. Pemeriksaan sitogenetik pada kasus ambigus genitalia penting untuk mengetahui kromosom kelamin sehingga dapat digunakan untuk penentuan gender penderita. Secara umum perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan merupakan proses yang sangat kompleks. Perkembangan prenatal organ genital memerlukan peran krusial dari kromosom Y. Struktur kromosom Y diduga mempunyai pengaruh terhadap fenotip seks secara tidak langsung. Penelitian terdahulu telah melaporkan adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigus genitalia.

Tujuan. Untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigus genitalia.

Metode. Penelitian deskriptif analitik tentang adanya abnormalitas kromosom Y dari 24 penderita ambigus genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik. Abnormalitas kromosom Y dideskripsikan berdasarkan ada atau tidaknya aberasi struktur kromosom Y dan dilakukan analisis perbedaan panjang kromosom Y antara penderita ambigus genitalia dengan laki-laki normal. Penelitian dilakukan di Pusat Riset Biomedik FK UNDIP, Semarang sejak Februari 2007 sampai dengan Mei 2008

Hasil. Penderita ambigus genitalia berjumlah 24 orang, didapatkan 1 sampel dengan abnormalitas kromosom Y berupa aberasi struktur yaitu 46, XY,dup (Ypter→q12). Rata-rata panjang kromosom Y pada sampel adalah 2,43 μ m (SD: 0,35) dan untuk kontrol adalah 2,54 μ m (SD : 0,31). Perbandingan panjang kromosom Y antara sampel dengan kontrol menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Fenotip penderita ambigus genitalia dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y bervariasi, pada sampel dalam penelitian ini termasuk *Quigley stage 3*.

Kesimpulan. Penderita ambigus genitalia berjumlah 24 orang, didapatkan 1 orang dengan abnormalitas kromosom Y berupa aberasi struktur. Perbandingan panjang kromosom Y antara penderita ambigus genitalia dengan laki-laki normal menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna. Fenotip penderita ambigus genitalia dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y bervariasi, pada penderita dalam penelitian ini termasuk dalam kriteria *Quigley stage 3*.

Kata kunci. Kromosom Y – abnormalitas – ambigus genitalia

Abstract

Background. Ambiguous genitalia is an abnormality signing by the presence of atypical appearance of external genitalia as male or female, or appear as combination of both male and female appearance. Study about it in Indonesia is still very few. Cytogenetic examination is an obligatory procedure in genetic sexing on ambiguous genitalia patients as part of genetics assignment. In general, prenatal developments of male and female genitalia are very complex. Some crucial loci on Y chromosome have a role in normal sexual development. The Y chromosome assumed have an influence on sexual phenotypes process, and so on ambiguous genitalia cases. Recent studies reported some cases of ambiguous genitalia with Y chromosome abnormality.

Purpose. To know whether there are Y chromosome abnormalities in patients with ambiguous genitalia.

Method. A descriptive analytic study about Y chromosome abnormality presented in 24 ambiguous genitalia patients. Y chromosome abnormality described by the present or the absent of structure aberration and analyzed the difference of Y chromosome length among ambiguous genitalia patients and normal males. This study done in the Centre for Biomedical Research Faculty of Medicine of Diponegoro University, Semarang, from Februari 2007 to Mei 2008.

Result. Twenty four ambiguous genitalia patients, found 1 sample with structure aberration 46, XY,dup (Ypter →q12). The mean length of Y chromosome for samples is 2,43µm (SD: 0,35) and 2,54 µm (SD : 0,31) for controls . There is no significant difference of Y chromosome length among samples and controls ($p>0,05$). Phenotype of ambiguous genitalia patients with structure aberration of Y chromosome may vary but sample in this study included in Quigley stage 3.

Conclusion. Twenty four ambiguous genitalia patients, found 1 sample with structure aberration of Y chromosome. There is no significant difference of Y chromosome length among ambiguous genitalia patients and normal males. Phenotype of ambiguous genitalia patient with structure aberration of Y chromosome may vary, patient in this study included Quigley stage 3.

Key words: Y chromosome- abnormality - ambiguous genitalia

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ambigus genitalia adalah suatu kelainan yang ditandai dengan adanya organ genitalia eksterna yang tidak jelas laki-laki atau perempuan, atau mempunyai gambaran kedua jenis kelamin.¹ Kelainan ini masih belum banyak diteliti di Indonesia.² Sejumlah penelitian menunjukkan angka kejadian yang terus meningkat, yaitu antara 1 dari 4500³ sampai dengan 1 dari 1000-2000 bayi lahir hidup.⁴ Di Indonesia sendiri belum banyak data yang menunjukkan angka kejadian ambigus genitalia. Tetapi, sejak tahun 1991 di Semarang telah dilakukan pemeriksaan sitogenetik terhadap lebih dari 100 sampel pasien dan hingga sekarang jumlah kasus yang ditemukan terus meningkat².

Pemeriksaan sitogenetik pada kasus ambigus genitalia antara lain untuk mengetahui kromosom kelamin penderita (genotip). Sebagaimana diketahui bahwa genotip penderita merupakan salah satu hal yang harus dipertimbangkan dalam penentuan jenis kelamin, selain beberapa faktor lainnya seperti tampilan genital luar, pilihan-pilihan koreksi kelamin yang dapat dilakukan, kebutuhan terapi sulih hormon seumur hidup, potensi fertilitas, keinginan orang tua atau keluarga, dan sejumlah faktor yang berhubungan dengan kultur setempat.⁵

Secara normal perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan merupakan proses yang sangat kompleks.⁶ Perkembangan prenatal organ genital memerlukan peran krusial dari kromosom Y.^{6,7} Sehingga struktur

kromosom Y diduga mempunyai pengaruh terhadap fenotip seks secara tidak langsung.⁸ Hal ini dapat dipahami oleh karena kromosom Y mengandung lokus krusial untuk diferensiasi seksual.⁶ Mutasi pada regio determinasi seksual (SRY) pada lengan pendek kromosom Y (Yp) dapat menyebabkan seorang individu XY menjadi seorang wanita dan sebaliknya seorang dengan kariotip 45,X yang disertai insersi SRY akan berfenotip seperti seorang laki-laki.⁹ Kromosom Y juga diperlukan dalam proses spermatogenesis pada laki-laki¹⁰ dan hilangnya suatu sekuen dari regio eukromatin pada lengan panjang kromosom Y, diduga sebagai penyebab utama infertilitas pada laki-laki.¹¹

Sejumlah penelitian menunjukkan adanya aberasi struktur kromosom pada penderita ambigu genitalia. Dua penelitian di India¹², masing-masing melaporkan satu kasus bayi ambigu genitalia dengan *ring chromosome 13* dan penelitian lainnya melaporkan satu kasus ambigu genitalia dengan delesi dan duplikasi lengan panjang kromosom Y.¹³ Sejumlah penelitian lainnya^{9,14-18}, melaporkan adanya inversi parasentrik, disentrik dan isodisentrik kromosom Y pada penderita ambigu genitalia. Demikian pula di Indonesia¹⁹, telah dilaporkan sebuah kasus ambigu genitalia di Semarang dengan *ring chromosome Y*.

Penelitian-penelitian yang dikembangkan akhir-akhir ini memperlihatkan kemajuan yang pesat dalam memahami aspek genetik yang mendasari terjadinya ambigu genitalia, secara kromosomal maupun molekuler. Walaupun demikian, pemeriksaan sitogenetik pada penderita ambigu genitalia di Indonesia masih belum banyak dilakukan, termasuk penelitian ambigu genitalia dengan konsentrasi pada profil sitogenetik kromosom Y penderita. Berdasarkan hal ini,

maka dilakukan penelitian untuk mendapatkan gambaran abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka masalah yang dapat dirumuskan adalah:

1.2.1 Umum

Apakah terdapat abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.

1.2.2 Khusus

1. Apakah terdapat aberasi struktur kromosom Y pada penderita ambigu genitalia
2. Apakah terdapat perbedaan ukuran kromosom Y pada penderita ambigu genitalia dengan orang normal
3. Bagaimanakah gambaran fenotip penderita ambigu genitalia dengan kariotip yang mengandung aberasi struktur kromosom Y

1.3 Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai profil sitogenetik penderita ambigu genitalia di Semarang telah dilakukan sejak beberapa tahun terakhir, tetapi penelitian dengan konsentrasi pada abnormalitas kromosom Y belum banyak dilakukan.

Tabel 1. Daftar penelitian mengenai profil sitogenetik penderita ambigu genitalia

| No. | Peneliti (daftar pustaka no.) | Judul artikel | Hasil |
|-----|--|---|--|
| 1. | Dundar M (17) | <i>A case of ambiguous genitalia presenting with a 45,X/46,Xr(Y)(p11.2;q11.23)/47,X,idic(Y)(p11.2),idic(Y)(p11.2) karyotype</i> | Satu kasus dengan 45,X/46,Xr(Y)(p11.2;q11.23)/47,X,idic(Y)(p11.2),idic(Y)(p11.2) |
| 2. | Bruyere, Speevak, Winsor, Fr'eminville, Farrell, Gowan-Jordan,et al (20) | <i>Isodicentric Yp: prenatal diagnosis and outcome in 12 cases.</i> | Hasil pemeriksaan cytogenetic Postnatal ditemukan <i>isodicentric Yp</i> . Pada 11 dari 12 kasus terdapat <i>mosaicism</i> . Terdapat 9 kasus yang lahir normal sebagai bayi laki-laki, 2 kasus kehamilan diterminasi dan bayinya memperlihatkan genital laki-laki. 1 kasus dengan penebalan ukuran <i>nuchal translucency</i> didiagnosis prenatal sebagai individu dengan 45,X dan lahir dengan ambigu Genitalia |
| 3. | DesGroseilliers M, Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N.(16) | <i>Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases</i> | 3 laki-laki, 5 wanita, dan 1 individu dengan ambigu genitalia. 2 laki-laki dengan kariotip nonmosaic, dan laki-laki ketiga dengan mosaic dimana <i>predominant</i> galur sel 46,XY . 3 wanita dengan sebagian besar galur selnya 45,X, 2 wanita lainnya dan individu dengan ambigu genitalia memiliki 46,X,idic(Y). Analisis terhadap jaringan gonad pada individual dengan ambigu genitalia dan 3 dari 5 wanita memperlihatkan hasil sesuai dengan fenotipnya sehingga dapat dipahami diferensiasi seksual pada kasus-kasus ini |
| 4. | Mundhofir FEP, Winarni TI, Juniarto AZ (19) | <i>Ring Chromosome Y in a boy with genital anomaly, a case report</i> | Satu kasus dengan kromosom cincin Y |
| 5. | Winarni TI, Juniarto AZ, Faradz SMH, Hamel B.(21) | <i>Chromosomal Finding Among Female with Amenorhe Primer.</i> | Terdapat 25,% (13 orang) subyek dengan aberasi struktural dan numerikal, 25,5% wanita dengan <i>male genotype</i> 46,XY, 49% dengan genotip wanita normal 46,XX |

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

- 1.4.1 Untuk ilmu pengetahuan yaitu menambah khasanah pengetahuan tentang berbagai abnormalitas kromosom yang mendasari suatu kelainan genetik seperti ambigu genitalia serta sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya mengenai ambigu genitalia.
- 1.4.2 Untuk pelayanan kesehatan yaitu memberikan informasi yang berguna bagi praktisi kedokteran tentang pentingnya pemeriksaan sitogenetik dalam pengelolaan penderita ambigu genitalia. Pada kondisi sarana dan prasarana pemeriksaan genetik masih terbatas maka pemeriksaan adanya aberasi struktur yang dapat dilihat secara sitogenetik dapat digunakan untuk memahami aspek genetik yang mendasari suatu kelainan seperti ambigu genitalia.
- 1.4.3 Untuk masyarakat yaitu memberikan informasi tentang pemeriksaan sitogenetik yang dapat dilakukan jika ditemukan kelainan ambigu genitalia di antara masyarakat.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.

1.5.2 Tujuan Khusus

- 1.5.2.1 Untuk mengetahui adanya aberasi struktur kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.

- 1.5.2.2 Untuk mengetahui adanya perbedaan ukuran kromosom Y pada penderita ambigus genitalia dengan orang normal
- 1.5.2.3 Untuk mengetahui gambaran fenotip penderita ambigus genitalia dengan kariotip yang mengandung aberasi struktur kromosom Y.

BAB 2

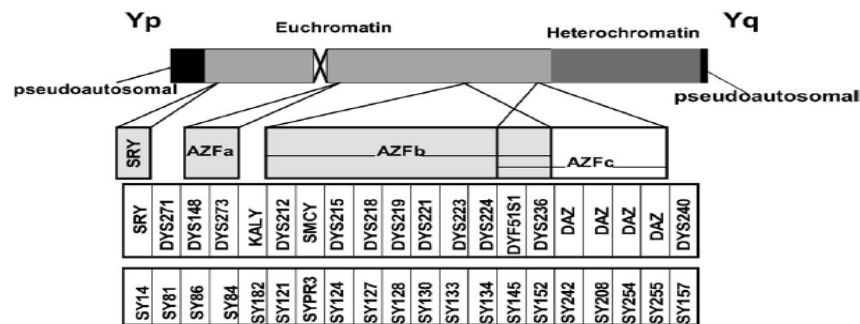
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kromosom Y

Kromosom Y adalah kromosom terkecil pada manusia yang diperlukan untuk perkembangan seksual dan spermatogenesis²². Kromosom Y sangat sedikit mengandung gen aktif dan sebagian besar strukturnya terdiri atas heterokromatin.²³

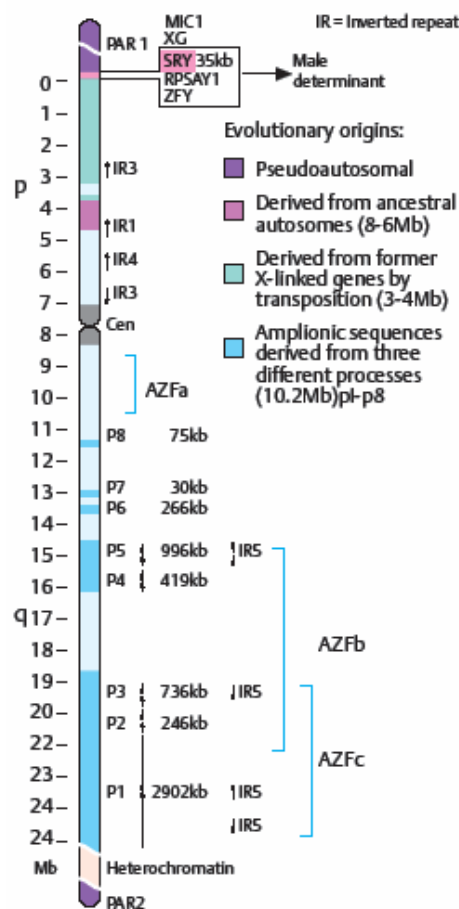
Regio heterokromatin sebuah kromosom adalah regio yang tercatat gelap (heteropiknosis positif) pada pemeriksaan sitogenetika²². Heterokromatin terdiri atas dua tipe, yaitu heterokromatin fakultatif dan konstitutif²². Heterokromatin konstitutif kaya dengan DNA repetitif yang mengandung sangat sedikit gen-gen struktural dan bersifat sangat polimorfik. Regio ini dapat dilihat secara sitogenetik dengan teknik pengecatan *C-banding* atau disebut sebagai *C-bands positive*²³.

Setengah dari lengan panjang kromosom Y bersifat *C-band positive* dan pada manusia regio ini bersifat sangat polimorfik²⁴. Sebuah penelitian pada beberapa kelompok ras²⁵ melaporkan tentang ukuran kromosom Y yang bervariasi di antara berbagai individu dan populasi etnik yang berbeda. Secara sitogenetik, ukuran kromosom Y mendekati ukuran kromosom 22, walaupun seringkali ukuran kromosom Y lebih besar²⁴. Sebuah literatur menyebutkan estimasi rata-rata ukuran kromosom Y adalah 60Mb²⁴. Gambar 1 memperlihatkan gambaran skematik regio eukromatik dan heterokromatik pada kromosom Y.



Gambar 1. Idiogram kromosom Y yang memperlihatkan regio eukromatin dan heterokromatin¹¹.

Kromosom Y yang merupakan penentu kelamin pada manusia ini mengandung 58 juta pasang basa dan merupakan 0,38% dari total DNA dalam sel.²⁰ Gambar 2 menunjukkan struktur genomik kromosom Y pada manusia.

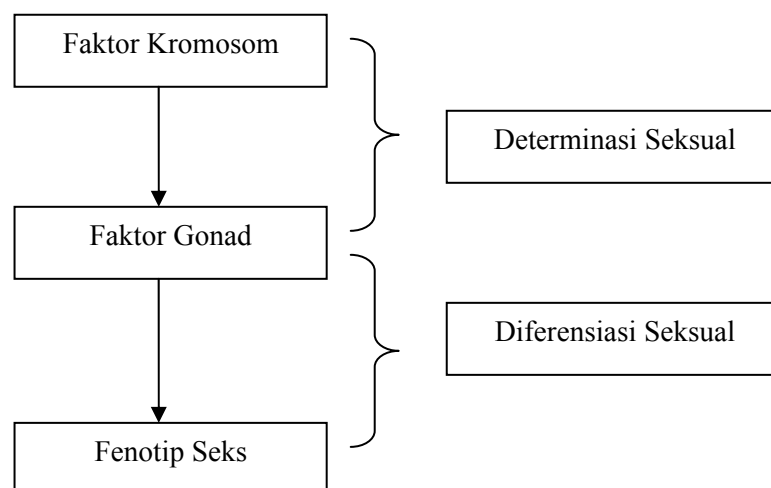


Gambar 2. Struktur genomik kromosom Y pada manusia²⁴

Berdasarkan gambar di atas, tampak sejumlah lokus krusial pada kromosom Y yang berperan dalam perkembangan seksual normal. Faktor transkripsi pada lengan pendek kromosom Y (SRY), berperan penting dalam pembentukan testis.²⁶ Sedangkan, gen-gen pada regio eukromatik lengan panjang kromosom Y (Yq11) berperan dalam spermatogenesis normal yaitu *azoospermia factors* yang terdiri atas AZFa, AZFb, dan AZFc.²⁶

2. 2 Kromosom Y dan Perkembangan Seksual Normal

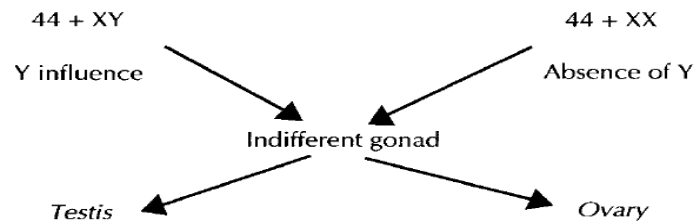
Secara normal perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan merupakan proses yang sangat kompleks.^{27,28} Jenis kelamin ditentukan oleh tiga faktor utama, yaitu faktor kromosom, faktor gonad dan faktor hormonal.^{27,28} Penentuan fenotip seks dimulai dari seks genetik yang kemudian diikuti oleh suatu kaskade, yaitu kromosom seks menentukan jenis gonad, gonad menentukan diferensiasi/regresi duktus internal (*mülleri* dan *wolfii*).^{4,26}



Gambar 3. Bagan tahapan-tahapan diferensiasi seksual²⁸

Perkembangan gonad dimulai pada sekitar minggu ketujuh masa gestasi dari mesoderm intermediet dan bersifat bipotensial, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi testis maupun ovarium.^{6,26} Telah dipahami bahwa pada saat konsepsi, kromosom kelamin telah terbentuk. Pada individu dengan kromosom seks XY, gonad indeferen akan berkembang menjadi testis dan akan menimbulkan maskulinisasi, sedangkan pada individu XX akan terbentuk ovarium.^{4,7,26} Jika ada jaringan testis maka terbentuk dua produk, yaitu testosteron dan substansi penghambat yaitu *mülleri inhibition stimulation* (MIS) atau *anti-mülleri hormon* (AMH) yang disekresi oleh sel sertoli testis yang berada dalam tubulus seminiferus. Peran utama MIS adalah merepresi perkembangan duktus *mülleri* (tuba falopii, uterus, vagina atas). Pada fetus laki-laki dengan fungsi testis normal, maka MIS merepresi perkembangan duktus *Mülleri* sedangkan testosteron menstimulasi perkembangan duktus *Wolfii*.^{27,28,29}

Testosteron yang diproduksi oleh sel Leydig testis akan merangsang duktus *Wolfii* (mesonefrik) agar berkembang menjadi epididimis, vas deferens dan vesikula seminalis.²⁹ Determinasi gonad indeferen menjadi testis dalam bulan kedua kehidupan fetus ini dipandu oleh informasi genetik yang ada pada lengan pendek kromosom Y (Y p11.3), yaitu pada area yang disebut area penentu seks pada kromosom Y yang mengandung gen SRY.²⁶ Gambar 4 memperlihatkan pengaruh kromosom Y dalam diferensiasi gonad.



Bagan 1. Pengaruh kromosom Y pada diferensiasi gonad³⁰

Gen lain yang penting dalam perkembangan testis antara lain DAX 1 (*double dose sensitive locus-Adrenal hipoplasia congenita critical region of X, gene 1*) pada kromosom X, SF1 (*steroidogenic factor 1*) pada 9q33, WT1 pada 11p13, SOX9 (*SRY-Box-related*) pada 17q24-q25, dan AMH (*Anti Mullerian Hormone*) pada 19q13.3.^{26,27,28}

Genitalia eksterna kedua jenis kelamin identik dalam 8 minggu pertama masa embrio.³⁰ Tanpa hormon androgen, testosteron dan dihidrotestosteron (DHT); fenotip suatu individu akan mengarah pada genitalia eksterna perempuan.²⁷ Pada gonad laki-laki, diferensiasi menjadi fenotip laki-laki secara aktif terjadi antara minggu 9-12 masa gestasi dan akan terbentuk sempurna sekitar minggu 12-14 masa gestasi.^{4,26-28} Diferensiasi ini dipengaruhi oleh testosteron, yang berubah menjadi 5-DHT karena pengaruh enzim 5-alfa reduktase yang ada didalam sitoplasma sel genitalia eksterna dan sinus urogenital.^{29,32,33} DHT berikatan dengan reseptor androgen dalam sitoplasma kemudian ditransport ke nukleus, selanjutnya menyebabkan translasi dan transkripsi material genetik. Pada akhirnya, menyebabkan perkembangan genitalia eksterna menjadi laki-laki normal.^{29,33}

Peran krusial kromosom Y juga dapat dijelaskan antara lain dari sejumlah penelitian yang menunjukkan kelainan kromosom Y pada laki-laki dengan infertilitas.⁸ Berdasarkan penelitian tersebut tampak bahwa kromosom Y juga diperlukan dalam proses spermatogenesis pada laki-laki.²⁷ Hilangnya suatu sekuen dari regio eukromatin pada lengan panjang kromosom Y, diduga sebagai penyebab utama infertilitas pada laki-laki.¹² Pada 10-20% laki-laki berfenotip normal yang mengalami infertilitas idiopatik, terdapat mikrodelesi pada regio eukromatik kromosom Y lengan panjang (Yq11) yang menyebabkan hilangnya gen yang penting untuk fertilitas yaitu *azoospermia factor* (AZF).^{10,12}

2.3 Ambigus Genitalia

Ambigus genitalia adalah suatu kelainan yang ditandai dengan adanya organ genitalia eksterna yang tidak jelas laki-laki atau perempuan, atau mempunyai gambaran kedua jenis kelamin.^{1,4} Kelainan ini dapat disebabkan oleh kelainan kromosom (genetik), kelainan hormonal, defisiensi enzim, dan kelainan lain yang sampai saat ini belum dapat dijelaskan, berasal dari jaringan fetus.⁴

Penyebab yang paling sering adalah suatu kelainan yang bersifat autosomal resesif yaitu “*congenital adrenal hyperplasia*” (CAH). Kelainan ini disebabkan oleh defisiensi enzim yang menyebabkan kelenjar adrenal memproduksi androgen dalam jumlah besar yang diturunkan secara autosomal resesif.^{4,7} Androgen yang berlebihan menyebabkan pembesaran klitoris pada perempuan, sehingga menyerupai penis.⁴

Penyebab lain adalah “androgen insensitivity syndrome” (AIS) yaitu suatu kelainan bersifat *X-linked resesive*. Kelainan ini disebabkan karena gangguan

produksi androgen atau respon inadekuat terhadap androgen yang menimbulkan maskulinisasi tak sempurna pada seorang individu dengan kariotip 46,XY.⁷ Bayi yang terkena “*complete androgen insensitivity syndrome*” memiliki testis (umumnya masih tetap di dalam abdomen) dan genitalia eksterna perempuan, walaupun tidak mempunyai uterus maupun ovarium.⁴

Beberapa kelainan kromosom juga dapat mengakibatkan ambigu genitalia. Termasuk dalam hal ini adalah disgenesis gonad yang terjadi pada bayi yang memiliki kromosom laki-laki normal (XY), dengan organ genitalia interna dan eksterna perempuan, atau genitalia eksterna ambigu dengan genitalia interna kombinasi antara laki-laki dan perempuan.^{4,7,27}

Tabel berikut memperlihatkan klasifikasi ambigu genitalia berdasar penyebabnya .

Tabel 2. Klasifikasi ambigu genitalia berdasar penyebabnya ²⁷

| <i>Type</i> | <i>Illustrative Examples</i> |
|--|--|
| <i>Masculinized Female</i> | |
| <i>Fetal androgens</i> | <i>CAH, plasental aromatase deficiency</i> <i>Ovarian & adrenal tumors</i> |
| <i>Maternal androgens</i> | |
| <i>Undermasculinized male</i> | |
| <i>Abnormal testis determination</i> | <i>Partial (XY) & mixed (X/XY) gonadal dysgenesis</i> |
| <i>Androgen biosynthetic defect</i> | <i>LH receptor inactivating mutations</i> <i>17βOH-dehydrogenase deficiency</i> <i>5α-reductase deficiency</i> |
| <i>Resistance to androgens</i> | <i>Androgen insensitivity syndrome variants</i> |
| <i>True hermaphroditism</i> | |
| <i>Presence of testicular & ovarian Tissue</i> | <i>Karyotypes XX, XY, XX/XY</i> |
| <i>Syndromal</i> | <i>Denys-Drash, Frasier, Smith-Lemli-Opitz</i> |

Meningkatnya kelahiran bayi dengan kelainan kongenital pada genitalia eksternal juga menimbulkan dugaan adanya *endocrine disruptor* dari lingkungan berupa obat-obatan atau bahan kimia sebagai faktor risiko penyebab ambigu genitalia.³¹ Bahan-bahan tersebut dapat mempunyai efek estrogenik maupun anti-androgenik yang dapat mengganggu proses perkembangan seksual normal pada janin yang terpajan. Kelainan yang dapat terjadi bervariasi antara hipospadia, *cryptorchidism*, hipoplasia vagina, dan deformitas uterus.³¹

Ambigus genitalia masih belum banyak diteliti di Indonesia.² Sejumlah penelitian di dunia menunjukkan angka kejadian yang terus meningkat, yaitu antara 1 dari 4500³ sampai dengan 1 dari 1000-2000 bayi lahir hidup.⁴ Di Indonesia sendiri belum banyak data yang menunjukkan angka kejadian ambigu genitalia. Tetapi, sejak tahun 1991 di Semarang telah dilakukan pemeriksaan sitogenetik terhadap lebih dari 100 sampel pasien dan hingga sekarang jumlah kasus yang ditemukan terus meningkat.²

Pengelolaan penderita ambigu genitalia memerlukan anamnesa dan pemeriksaan fisik yang lengkap.¹ Pemeriksaan genitalia eksterna meliputi: ukuran phallus, lokasi muara urethra, adanya satu atau dua orificium pada perineum, adanya bifida scrotum atau fusi labia, serta lokasi atau teraba tidaknya gonad.²⁷ Terdapat beberapa sistem penentuan derajat hipovirilisasi dan virilisasi pada penderita *disorders of sex development* (DSD).^{1,27} *Quigley stage*, dipakai untuk menilai derajat hipovirilisasi pada individu 46,XY DSD (dulu disebut *male pseudohermaphrodite*) misalnya pada kasus *Androgen Insensitivity Syndrome*. Sedangkan, *Prader stage* digunakan untuk menilai derajat virilisasi pada kasus

46,XX, DSD (dulu disebut *female pseudohermaphrodite*) misalnya pada kasus *Congenital Adrenal Hyperplasia*.²⁷

Pemeriksaan sitogenetik pada kasus ambigu genitalia antara lain untuk mengetahui kromosom kelamin penderita (genotip). Sebagaimana diketahui bahwa genotip penderita merupakan salah satu hal yang harus dipertimbangkan dalam penentuan jenis kelamin, selain beberapa faktor lainnya seperti tampilan genital luar, pilihan-pilihan koreksi kelamin yang dapat dilakukan, kebutuhan terapi sulih hormon seumur hidup, potensi fertilitas, keinginan orang tua atau keluarga, dan sejumlah faktor yang berhubungan dengan kultur setempat.⁶

2.4 Abnormalitas Kromosom Y dan Ambigus Genitalia

Kelainan kromosom dapat menimbulkan masalah fungsional pada berbagai organ dan seringkali berhubungan dengan kesulitan dalam penentuan jenis kelamin pada beberapa kasus ambigu genitalia.^{19,34}

Struktur kromosom Y diduga mempunyai pengaruh terhadap fenotip seks secara tidak langsung.⁹ Hal ini dapat dipahami oleh karena kromosom Y mengandung lokus krusial untuk diferensiasi seksual, seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Mutasi pada regio determinasi seksual (SRY) kromosom Y dapat menyebabkan seorang individu XY menjadi seorang wanita dan sebaliknya seorang dengan kariotipe 45,X yang disertai insersi SRY akan berfenotip seperti seorang laki-laki.¹⁰

Aberasi struktural kromosom Y pada penderita ambigu genitalia yang pernah dilaporkan adalah kromosom cincin, disentrik, isodisentrik lengan pendek kromosom Y, dan delesi sebagian besar lengan panjang kromosom Y.^{10,14-19}

Aberasi kromosom yang dapat dilihat secara sitogenetik; seringkali berhubungan dengan adanya galur sel 45,X yang menunjukkan suatu instabilitas mitotik penyebab abnormalitas kromosom.^{9,35}

Sejumlah kasus memperlihatkan pengaruh galur sel 45,X terhadap fenotip seks seperti pada penderita ambigu genitalia atau pada wanita dengan disgenesis gonad, serta sindrom Turner.⁹ Kariotip abnormal lainnya seperti pada kasus dengan *mosaic* kromosom Y atau *chimerisme* dengan 46,XX/46XY juga memperlihatkan adanya kelainan diferensiasi seksual.^{35,36}

Sebuah penelitian pada 9 kasus dengan kariotip yang mengandung isodisentrik kromosom Y, memperlihatkan fenotip yang sangat bervariasi.¹⁵ 75-80% penderita memiliki tubuh yang pendek dan 65-75% dengan ambiguitas seksual. Isodisentrik kromosom adalah bentuk aberasi kromosom Y yang paling sering ditemui. Fenotip yang dihasilkan sangat tergantung pada proporsi galur sel yang terbentuk dan lokasi patahnya kromosom.¹⁶

Kromosom cincin Y adalah suatu bentuk aberasi kromosom lainnya, yaitu aberasi struktur kromosom Y dengan bentuk seperti cincin. Aberasi ini terjadi karena adanya delesi pada kedua ujung kromosom (telomer).²⁴ Telah diketahui bahwa telomer berfungsi untuk mencegah perlekatan kromosom dengan kromosom lainnya. Apabila penyatuan kedua ujung kromosom yang kehilangan telomer terjadi antara dua lengan kromosom yang sama, maka terbentuklah kromosom cincin.²⁴ Sedikitnya 1/1300 laki-laki lahir dengan berbagai aberasi kromosom, tetapi laporan kasus kromosom cincin Y sangat jarang yaitu hanya sekitar 30 kasus yang pernah dilaporkan di dunia.¹⁹

Sejumlah kasus dengan delesi kromosom Y yang pernah dilaporkan, menimbulkan dugaan bahwa kromosom ini memiliki kerentanan untuk kehilangan spontan materi genetik yang dikandungnya.¹² Delesi kromosom dapat terjadi karena beberapa mekanisme berikut, yaitu: aberasi rekombinan antara daerah homolog atau sejumlah sekuen yang mirip antara kromosom X dan Y, aberasi rekombinan intrakromosomal karena pertukaran *sister chromatid* yang tidak seimbang, atau penyisipan pada saat replikasi DNA.¹²

Pada kasus dengan kromosom cincin yang terjadi karena delesi pada kedua ujung kromosom, akan menghasilkan fenotip yang merupakan gabungan dari sindrom yang mungkin disebabkan oleh masing-masing bagian kromosom yang hilang.¹⁹ Hilangnya bagian lengan Yq dan Yp dari kromosom Y dapat menimbulkan *non-obstructive* azoospermia atau oligospermia berat.¹⁹ Dengan demikian, aberasi kromosom ini pada perkembangan selanjutnya menimbulkan ketidaksempurnaan fungsi seksual seorang laki-laki.

Suatu aberasi struktur kromosom Y memerlukan konfirmasi dengan pemeriksaan sitogenetik molekuler. Sitogenetika molekuler atau yang biasa disebut dengan *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) adalah suatu visualisasi dari lokus atau gen atau sekuens DNA pada kromosom tertentu dengan menggunakan teknik biokimia yang dinamis dari hibridisasi “in situ”.³⁷ Tujuan FISH adalah untuk mendeteksi perubahan kromosom yang kecil yang tidak dapat dilihat dengan mikroskop cahaya.²⁴ Sebagaimana diketahui bahwa analisis kromosom konvensional hanya dapat mendeteksi hilang atau bergabungnya material kromosom yang berukuran lebih dari atau sama dengan 4 Mb.²⁴

Sebetulnya tehnik ini sudah dimulai sejak tahun 1960-an dengan hibridisasi DNA probe bermuatan radioaktif. Kemudian berkembang menjadi hibridisasi in situ non isotop yang lebih murah dan aman. FISH adalah suatu bentuk hibridisasi insitu pada kromosom, dimana probe asam nukleat dilabel dengan inkorporasi bahan *fluorophore* yaitu grup bahan kimia yang berpendar ketika dipapar dengan iradiasi ultraviolet. Hibridisasi dengan probe warna pada DNA ini dapat dilakukan secara simultan untuk beberapa macam *probe* (lokus). Deteksi warna dilakukan dengan mikroskop fluoresen yang menggunakan filter khusus dan ditayangkan serta direkam pada perangkat lunak komputer.³⁷

Ukuran kromosom Y pada berbagai variasi fenotip ambigus genitalia tampaknya juga bervariasi.¹⁴ Pada kasus ambigus genitalia dengan delesi dan duplikasi lengan panjang kromosom Y, ditemukan panjang kromosom Y dalam batas normal tetapi dengan *C-band*-negatif.¹⁴ Hal ini diduga karena adanya delesi regio heterokromatin lengan panjang kromosom Y sekaligus duplikasi regio eukromatin lengan pendek kromosom Y penderita.¹⁴

Beberapa penelitian terdahulu juga telah menjelaskan tingginya temuan polimorfisme struktural kromosom Y yang dapat dilihat secara sitogenetik berdasarkan variasi panjang regio eukromatin dan heterokromatin kromosom Y.^{19,21,22,32} Pengukuran panjang kromosom Y telah dilakukan dengan beberapa metode seperti pengukuran langsung dengan menggunakan penggaris pada *negative film* dari foto 3 buah metafase dalam sebuah sel dan dengan menggunakan densitometri. Analisis ukuran kromosom Y dapat dilakukan menurut metode Patil dan Lubs,²³ yaitu dengan membandingkan panjang regio

heterokromatik kromosom Y dengan panjang lengan pendek kromosom 16 sel yang sama. Patil dan Lubs menetapkan 5 level variasi *C-bands* sebagai berikut:

Tabel 3. Level variasi *C-bands* menurut Patil dan Lubs²³

| Level | Ukuran Relatif |
|-------|------------------------|
| 1 | $\leq 0.5 \times 16p$ |
| 2 | $> 0.5 - 1 \times 16p$ |
| 3 | $> 1 - 1.5 \times 16p$ |
| 4 | $> 1.5 - 2 \times 16p$ |
| 5 | $> 2 \times 16p$ |

Metode lainnya adalah dengan menggunakan indeks heteromorfisme kromosom 1²⁶. Berdasarkan metode ini, dapat diperkirakan apakah terjadi penambahan atau pengurangan panjang kromosom Y akibat kontraksi kromosom yang sering terjadi pada regio eukromatik dan heterokromatik.

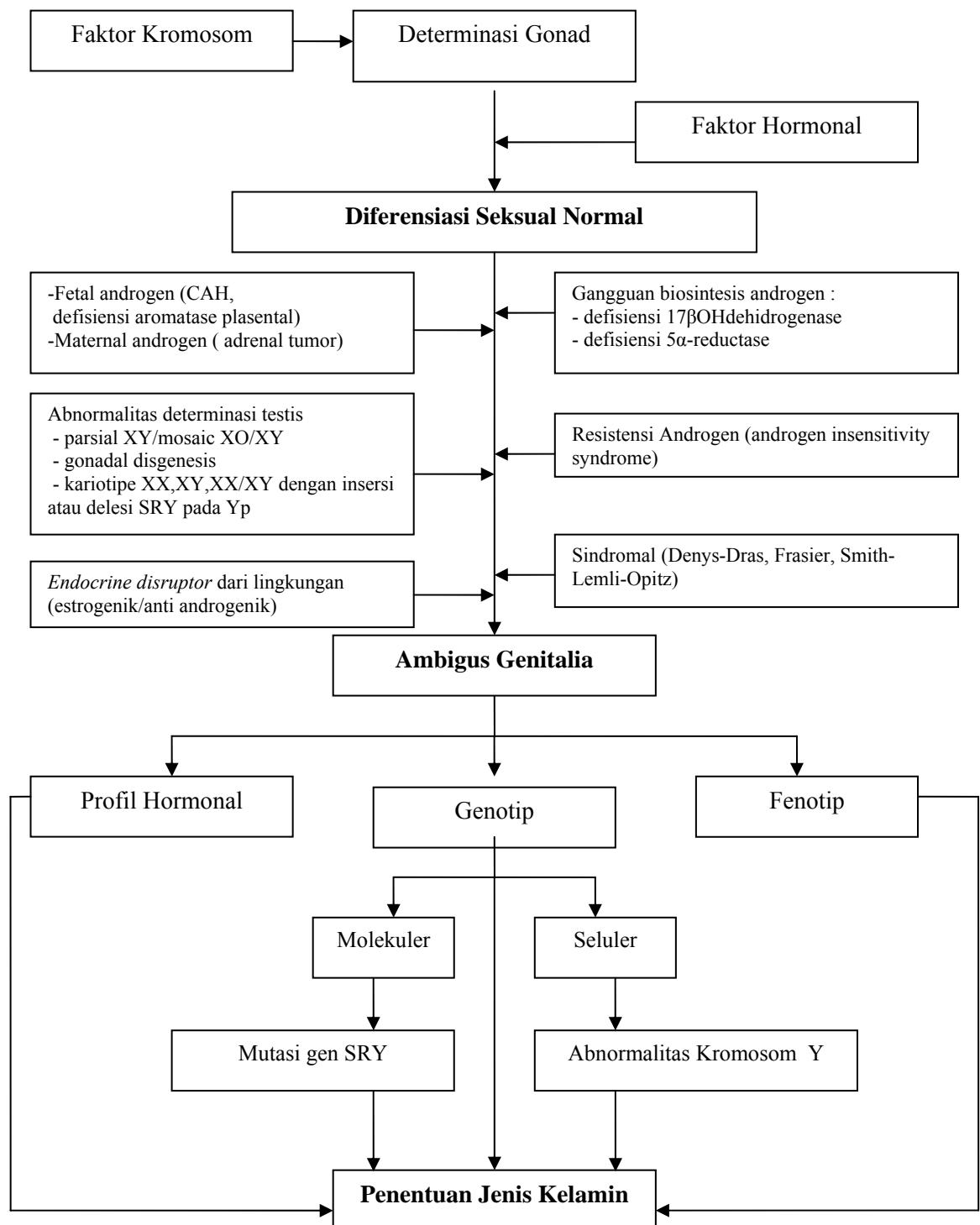
Preliminary study yang dilakukan di Pusat Riset Biomedik FK UNDIP untuk mengukur panjang kromosom Y pada 20 orang bukan penderita ambigus genitalia, memperlihatkan hasil yang bervariasi dengan panjang rata-rata 2,88 μ m dan simpang baku 0,53 (data terlampir).

2.5 Kerangka Teori Dan Kerangka Konsep

2.5.1 Kerangka Teori

Secara normal perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan merupakan proses yang sangat kompleks. Diferensiasi seksual normal ditentukan oleh tiga faktor utama, yaitu faktor kromosom, faktor gonad dan faktor

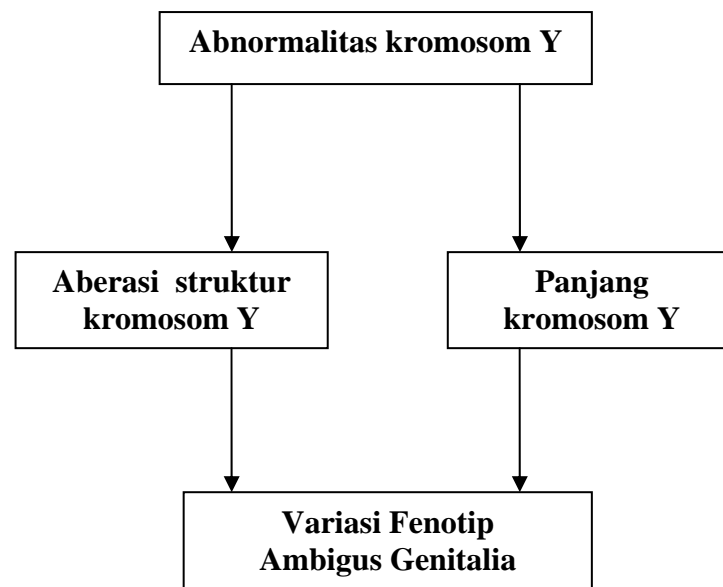
hormonal. Kelainan kromosom (genetik), kelainan hormonal, defisiensi enzim, dan kelainan lain yang sampai saat ini belum dapat dijelaskan mengakibatkan gangguan dalam diferensiasi seksual yang dapat menyebabkan terjadinya ambigu genitalia. Salah satu hal penting dalam pengelolaan penderita ambigu genitalia adalah penentuan jenis kelamin. Penentuan jenis kelamin dapat dibuat berdasarkan tampilan genital eksterna dan interna (fenotip), kromosom kelamin (genotip), dan profil hormonal penderita. Pemeriksaan sitogenetik pada kasus ambigu genitalia penting untuk mengetahui kromosom kelamin pada penderita sebagai salah satu hal yang dipertimbangkan dalam penentuan jenis kelamin. Bagan kerangka teori adalah sebagai berikut.



Bagan 2. Kerangka teori

2.5.2 Kerangka Konsep

Berdasarkan kerangka teori di atas, beberapa variabel tidak diukur dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan oleh karena pemeriksaan fisik genital eksterna dan interna, hormon seksual serta pemeriksaan gonad sudah dilakukan oleh Tim Penyesuaian Kelamin RSUP DR.Kariadi dan FK UNDIP. Peneliti hanya melakukan eksplorasi lebih jauh dalam pemeriksaan sitogenetik yaitu dengan fokus pada kromosom Y penderita dan memberikan deskripsi genitalia eksterna penderita di bawah supervisi Tim Penyesuaian Kelamin RSUP DR.Kariadi dan FK UNDIP sehingga didapatkan kerangka konsep sebagai berikut :



Bagan 3. Kerangka konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif analitik untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia. Abnormalitas kromosom Y dideskripsikan berdasarkan ada atau tidaknya aberasi struktur kromosom Y dan dilakukan analisis terhadap perbedaan panjang kromosom Y antara penderita ambigu genitalia dengan laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dilakukan dari bulan September 2007 sampai dengan Agustus 2008.

3.2. Populasi, Sampel dan Kontrol

3.2.1 Populasi target

Populasi target dalam penelitian ini adalah penderita ambigu genitalia.

3.2.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah pasien ambigu genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

3.2.3 Sampel

Sampel adalah populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Pasien-pasien yang secara fisik memenuhi kriteria sebagai penderita ambigus genitalia oleh tim penyesuaian kelamin RSUP Dr. Kariadi dan FK UNDIP. Kriteria tersebut meliputi:

- a. Pasien dengan kelainan genitalia eksterna dan atau dengan hipospadia berat (*orifisium urethrae externum* terletak pada scrotum atau perineum)
- b. Pada pemeriksaan klinis menunjukkan kelainan (hipo/hypervirilisasi, lokasi dan ukuran gonad)

2. Pada pemeriksaan sitogenetik mengandung 1 kromosom Y

3. Bersedia mengikuti penelitian yang dinyatakan dalam surat pernyataan

Kriteria Eksklusi yaitu penderita ambigus genitalia yang memiliki *multiple malformation*

Jumlah sampel minimal 24 orang berdasarkan rumus berikut.

$$N = 2 \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta)s}{Xa - Xo} \right)^2$$

(ditetapkan $\alpha = 0,05$; power penelitian: 90%; beda panjang kromosom Y yang dianggap bermakna $\geq 0,5\mu\text{m}$)

$$N = 2 \left(\frac{(1,96 + 1,282)0,53}{3,38 - 2,29} \right)^2$$

$$N = 2 \left(\frac{3,242 \times 0,53}{0,5} \right)^2 = 24$$

Pengambilan sampel dengan cara *consecutive random samplings*. Semua pasien yang datang dalam periode penelitian dan telah didiagnosa sebagai penderita ambigus genitalia oleh tim penyesuaian kelamin RSUP Dr. Kariadi dan

FK UNDIP, dilakukan pemeriksaan sitogenetik dengan teknik *G-banding*. Penderita dengan hasil kariotip mengandung 1 kromosom Y diambil sebagai sampel penelitian. Pengambilan sampel dihentikan ketika jumlah sampel minimal terpenuhi.

3.2.4 Kontrol

Kontrol tanpa batasan umur diambil dari populasi laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik. Laki-laki normal yang dimaksud adalah laki-laki dewasa yang telah berkeluarga dan mempunyai anak. Dasar pemikiran pengambilan populasi ini sebagai kontrol adalah bahwa pada kromosom Y terdapat faktor penentu fertilitas (gen AZFa, AZFb, dan AZFc), maka berarti bahwa laki-laki dewasa yang telah berkeluarga dan mempunyai anak tidak mengalami kelainan pada gen ini sehingga memiliki kromosom Y yang normal secara struktural. Kontrol juga tidak dibatasi berdasarkan umur oleh karena dalam literatur tidak disebutkan bahwa panjang kromosom Y berbeda berdasarkan umur seorang laki-laki. Data hasil pengukuran panjang kromosom Y pada kontrol ini akan digunakan untuk perbandingan dengan panjang kromosom Y penderita ambigu genitalia.

Kontrol diambil dari sejumlah mahasiswa S2 dan staf pada Pusat Riset Biomedik. Kontrol yang telah menyatakan bersedia, diminta data pribadinya dan ditanya tentang ada atau tidaknya riwayat infertilitas. Kontrol yang tidak memiliki riwayat infertilitas diambil dengan jumlah equal terhadap sampel, yaitu 24 orang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel terikat adalah variasi fenotip ambigu genitalia.

Variabel bebas adalah :

- aberasi struktur kromosom Y
- panjang kromosom Y

3.4 Definisi Operasional, Pengukuran dan Skala Ukur

1. Abnormalitas kromosom Y yang diteliti adalah adanya aberasi struktur dan perbedaan panjang kromosom Y antara penderita ambigu genitalia dengan orang normal.
 - a. Aberasi struktur adalah perubahan kontinuitas kromosom karena patahnya suatu segmen dari kromosom Y, tipe-tipenya adalah sebagai berikut ^{23,24}.
 - Delesi kromosom adalah perubahan struktur normal kromosom karena hilangnya suatu segmen dari kromosom karena patahnya kromosom tersebut. Delesi dapat terjadi pada bagian ujung kromosom (delesi terminal) atau pada segmen antara kromosom (delesi intersisial) ^{23,24}
 - Duplikasi kromosom utamanya terjadi sebagai supernumerari kromosom kecil ^{23,24}
 - Isokromosom adalah duplikasi lengan kromosom yang terjadi jika suatu kromosom normal terbelah secara transversal atau longitudinal sehingga salah satu lengannya hilang kemudian terjadi penggabungan dua lengan panjang atau lengan pendek dimana lengan lainnya berasal dari kromosom lain ^{23,24}

- Inversi adalah perubahan segmen kromosom akibat patahnya kromosom pada dua sisi yang berbeda diikuti dengan penggabungan segmen-segmen secara terbalik. Berdasar pada ikut atau tidaknya sentromer dalam segmen yang terbalik maka inversi terbagi dua yaitu inversi perisentrik (melibatkan sentromer) dan inversi parasentrik (tidak melibatkan sentromer)^{23,24}
- Kromosom cincin terjadi karena patahnya kedua ujung suatu kromosom yang diikuti dengan penggabungan kedua ujung kromosom yang tertinggal^{23,24}
- Translokasi adalah pertukaran materi genetik antara dua atau lebih kromosom nonhomolog yang dapat terjadi karena adanya dua atau lebih patahan kromosom pada waktu yang bersamaan²³

b. Ukuran panjang kromosom Y adalah keseluruhan panjang kromosom yang meliputi lengan panjang dan lengan pendek kromosom Y, dinyatakan dalam satuan mikron meter (μm).²² Pengukuran dilakukan pada 3 metafase berbeda hasil pengecatan *G-banding* yang memenuhi kriteria banding level 550 berdasarkan indikator kualitas banding ISCN, yaitu:

- Pada lengan panjang kromosom 18 (18q) terdapat 4 pita gelap
- Pada kromosom 10 terdapat split antara 10q21, 10q23, dan 10q25
- Pada kromosom 7, 7q33 dan 7q35 terlihat dengan jelas
- Pada kromosom 22, 22q13.2 dapat terlihat.

2. Fenotip adalah tanda fisik yang meliputi adanya kelainan genitalia eksterna dan atau dengan *hypospadia* berat (*orifisium urethrae externum* terletak pada

scrotum atau perineum) disertai adanya tanda hipo/hipervirilisasi yang selanjutnya diklasifikasikan menurut *Quigley Stage*.

Quigley stage adalah skala yang digunakan untuk membagi kelainan ambigu genitalia menjadi 7 derajat untuk menilai derajat *undermasculinization* yaitu³³

Stage 1 : yaitu fenotip laki-laki normal dengan azoospermia dan tanda-tanda hormon androgen *insensitivity* atau laki-laki fertil dengan ginekomastia.

Stage 2: yaitu fenotip laki-laki dengan defisiensi virilisasi ringan seperti hipospadia simpel atau *bifida scrotum* atau mikropenis dan ginekomastia.

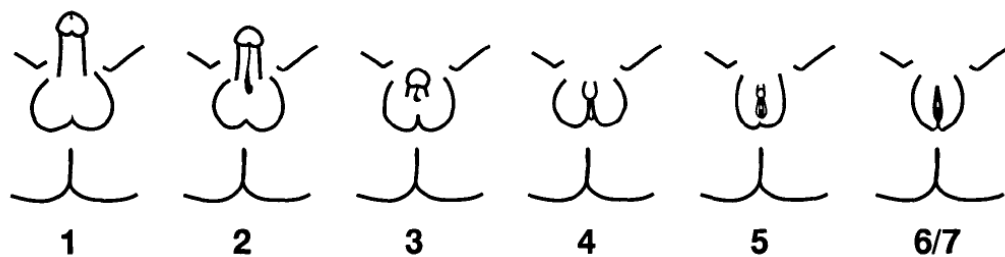
Stage 3: yaitu fenotip dengan sedikit lebih banyak virilisasinya dan mirip laki-laki dengan defisiensi virilisasi. Penderita mempunyai mikropenis, hipospadia, *bifida scrotum* yang tipis.

Stage 4: neonatus dengan *scrotalized* labia dan phallus dengan ukuran antara klitoris dan penis (ambigus genitalia).

Stage 5: wanita dengan klitoromegali dan atau fusi labial posterior.

Stage 6 : tampak aksi androgen yang minimal. Wanita dengan genitalia eksterna yang komplis dan pada saat pubertas tampak pertumbuhan normal rambut pubis dan aksila wanita.

Stage 7: genitalia wanita dengan tidak adanya /hanya sedikit rambut vulva atau pubis.



Gambar 4. *Quigley stage*³³

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat untuk pemeriksaan fisik penderita dan pemeriksaan sitogenetik dengan teknik *G-banding* dan konfirmasi heterokromatin pada kromosom Y dengan *C-banding* (terlampir)

3.6 Cara Penelitian

3.6.1 Pemeriksaan Fisik

Pemeriksaan fisik penderita ambigus genitalia dilakukan di bawah supervisi Tim Penyesuaian Kelamin RSUP Dr. Kariadi dan FK UNDIP. Tanda fisik yang diamati meliputi genitalia eksterna yaitu: ukuran *phallus*, lokasi atau teraba tidaknya gonad serta volume gonad, lokasi muara urethra, adanya satu atau dua *orificium* eksterna pada perineum, dan adanya *bifida scrotum* atau *fusi labia*. Panjang *phallus* diukur dari pangkal ke arah *gland penis* dengan menggunakan penggaris yang ditekan ke arah *symphysis pubis* dan *phallus* diregangkan. Volume gonad diukur dengan menggunakan *orchidometer Prader*. Hasil pemeriksaan genitalia ini diklasifikasikan menurut *Quigley Stage*.

3.6.2 Pemeriksaan Kromosom

Pemeriksaan sitogenetik konvensional dilakukan dengan menggunakan limfosit darah perifer dari sampel maupun kontrol. Pembuatan kariotip dilakukan dengan teknik *G-banding* dan analisis struktur kromosom Y dengan teknik *C-banding*. (lihat lampiran)

Kariotip dengan pengecatan *G-banding* digunakan untuk analisis aberasi struktur kromosom Y dan mengukur keseluruhan panjang kromosom Y. Analisis dilakukan pada 8 metafase dan menghitung 20 metafase, jika ditemukan *mosaic* maka penghitungan dilanjutkan hingga 40 metafase.

Pengecatan *C-banding* digunakan untuk memastikan adanya regio heterokromatin yang dinyatakan sebagai *c-band positive* atau *c-band negative*, juga digunakan untuk konfirmasi adanya aberasi struktur terutama pada kasus dengan inversi pada kromosom Y. Analisis ini juga dilakukan pada 8 metafase dan menghitung 40 metafase.

3.6.3 Analisis Kromosom Y

Analisis kromosom Y dibuat berdasarkan *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). Pengukuran panjang kromosom Y pada sampel dan kontrol dilakukan dengan menggunakan program Leica CW4000 yaitu pada 3 metafase yang telah dibuat dengan pengecatan *G-banding* dan sebaran kromosomnya baik.¹⁹ Kriteria sebaran kromosom yang baik (*good spreads*) adalah terdapatnya kromosom yang cukup panjang, sedikitnya kromosom yang bertumpang tindih, dan *bands* yang jelas. Hal ini dapat diperoleh dengan menetapkan *banding level 550* harus dicapai dalam pembuatan kariotip.²³

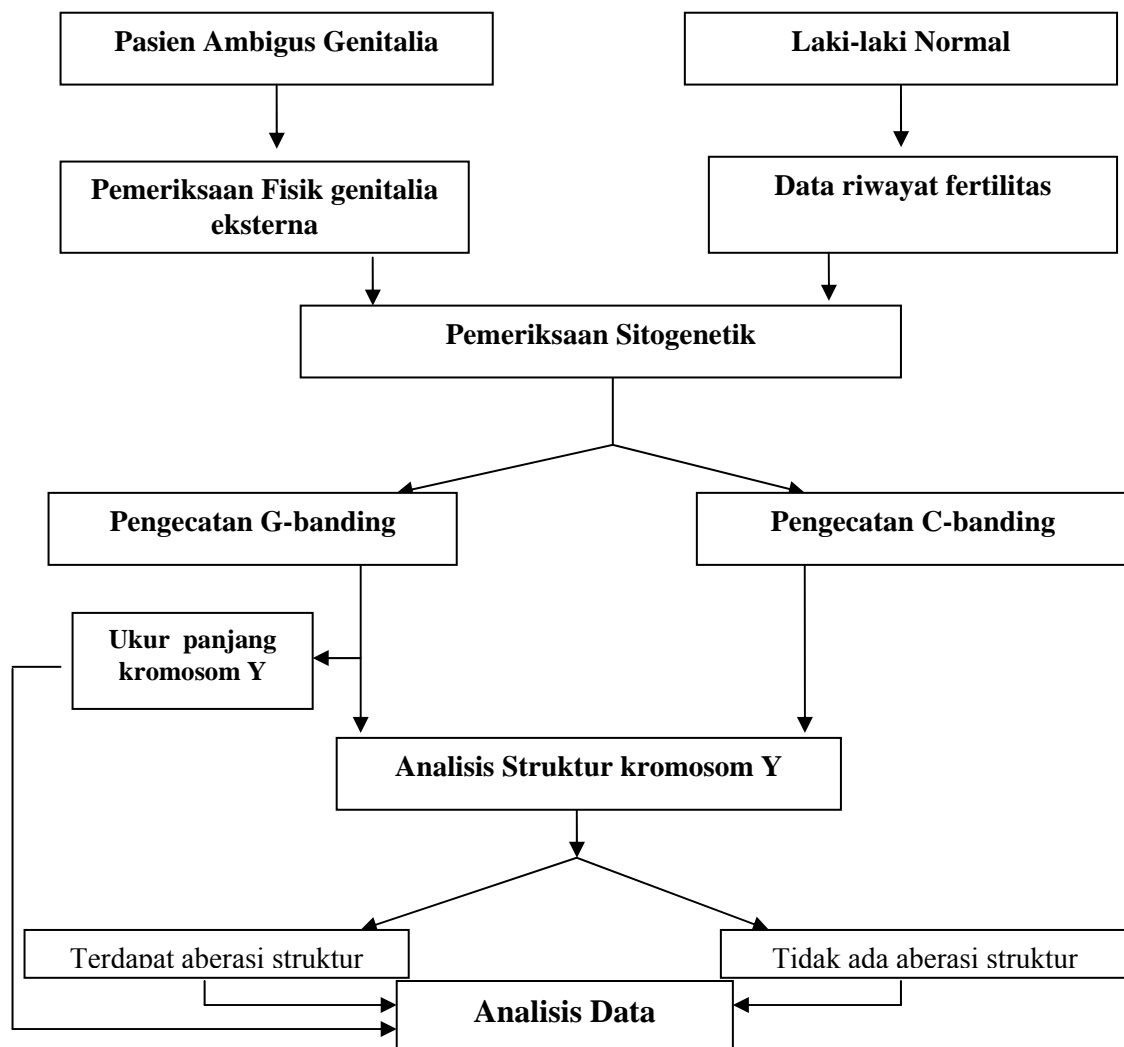
Usaha mencapai banding level ini dilakukan dengan cara berikut ini.

1. ketelitian pada saat preparasi kromoson meliputi ketepatan pengambilan jumlah darah dan *buffy coat* yang akan dikultur serta ketepatan volume nutrisi yang diberikan pada media, juga dengan menggunakan media kultur yang baru.
2. *spreading* berulang-ulang, yaitu dengan membuat 10 slide untuk setiap pasien.

3. 6.4 Alur Penelitian

Penderita ambigu genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik dalam periode penelitian, mula-mula diminta biodatanya dan membuat pernyataan setuju atau tidak setuju untuk dilibatkan dalam penelitian. Penderita tersebut selanjutnya diperiksa fisik genitalia eksternanya dan dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan sitogenetik. Penderita dengan hasil kariotip mengandung kromosom Y diambil sebagai sampel penelitian. Laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik juga diminta biodata dan mengisi surat pernyataan setuju atau tidak setuju untuk dilibatkan dalam penelitian ini. Mereka yang setuju untuk terlibat dalam penelitian ini selanjutnya ditanya tentang riwayat fertilitasnya. Mereka yang tidak memiliki riwayat infertilitas diambil sebagai kontrol dan dilakukan pemeriksaan sitogenetik. Hasil pemeriksaan sitogenetik dengan teknik pengecatan *G-banding* digunakan untuk analisis ada atau tidaknya aberasi struktur dan mengukur panjang kromosom Y. Analisis kemungkinan adanya aberasi struktur juga dilakukan dengan metafase hasil pengecatan *C-banding*. Berdasarkan data hasil pemeriksaan sitogenetik ini selanjutnya dibuat analisis data

untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia. Bagan alur penelitian ini adalah sebagai berikut.



Bagan 4. Alur penelitian

3.7 Analisis data

Analisis data secara deskriptif dengan menggunakan program SPSS 15.0 untuk statistik deskriptif. Data panjang kromosom Y diuji normalitas distribusi datanya dengan tes Shapiro-Wilk. Berdasarkan hasil tes Shapiro-Wilk yang

menunjukkan bahwa distribusi data tidak normal maka dilakukan uji dengan Mann- Withney.

3.8 Etika Penelitian

3.7.1 *Ethical Clearance* diajukan kepada komite etik FK UNDIP dan RSUP Dr. Kariadi Semarang

3.7.2 *Ethical Clearance* berisi antara lain :

- penelitian ini merupakan penelitian observasional sehingga tidak dilakukan intervensi, tetapi dilakukan beberapa pemeriksaan yang mungkin menimbulkan ketidaknyamanan, tetapi tidak akan membahayakan atau menimbulkan cedera.
- *Informed consent* dijelaskan kepada subyek dan orangtua dan dimintakan ijin agar sampel darah diperbolehkan untuk pemeriksaan sitogenetik. Penandatanganan *informed consent* oleh orang tua atau subyek yang telah dewasa.

3.9.1 Kerahasiaan subyek tetap dijaga dan data yang diperoleh hanya digunakan untuk kepentingan ilmiah dan publikasi ilmiah.

BAB 4

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penderita ambigus genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik selama periode Februari 2007 sampai dengan Mei 2008 berjumlah 80 orang. Penderita yang memenuhi kriteria inklusi penelitian ini diambil sebagai sampel penelitian sebanyak 24 orang.

Usia sampel penelitian berkisar antara 8 bulan sampai dengan 39 tahun. Hasil pemeriksaan fisik genitalia eksterna pada sampel penelitian memperlihatkan karakteristik bervariasi. Derajat hipospadia bervariasi dari sedang sampai dengan berat yaitu hipospadia *penoscrotal*, *scrotal*, dan *perineal*. Gonad bervariasi yaitu sebagian dengan lokasi yang normal pada *scrotum*, lainnya hanya teraba pada satu sisi *scrotum* (teraba unilateral), dan beberapa tidak teraba pada *scrotum* bilateral. Panjang *phallus* juga bervariasi berdasar usia sampel penelitian. Karakteristik fisik genitalia eksterna sampel tersebut adalah sebagai berikut.

Tabel 4. Karakteristik fisik genitalia eksterna sampel penelitian

| No. | Usia (tahun) | Hipospadia | Gonad | | Phallus | | | <i>Quigley stage</i> | |
|-----|--------------|-------------|--|-------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|---------------------------------|
| | | | Lokasi | Volume (mL) | Ukuran persentil | Panjang Phallus (cm) | Ukuran persentil | | Chordae ada(+) / tidak ada (-) |
| 1 | 8 | Perineal | Kanan kiri tidak teraba di scrotum | - | - | 2 | < 10 | - | 3 |
| 2 | 20 bulan | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 1 | 10 | 2 | < 10 | + | 3 |
| 3 | 6 | Penoscrotal | Scrotal kanan kiri | 1 | < 10 | 3 | < 10 | + | 3 |
| 4 | 4 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 2-3 | 90 | 3,5 | < 10 | - | 1 |
| 5 | 18 bulan | Penoscrotal | Scrotal kanan kiri | 2-3 | 90 | 3 | < 10 | + | 3 |
| 6 | 14 | Scrotal | Kanan tidak teraba di scrotal, kiri scrotal | 8-10 | 50 | 4 | < 10 | + | 1 |
| 7 | 2 | Scrotal | Kanan scrotal, kiri <i>posibble</i> inguinal | 1 | 10 | 1,5 | < 10 | + | 4 |
| 8 | 13 | Scrotal | Kanan tidak teraba di scrotal, kiri scrotal | 3 | 10 | 4,1 | < 10 | + | 3 |
| 9 | 2 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 2 / 1 | 50 | 2 | < 10 | + | 3 |
| 10 | 1 | Perineal | Scrotal kanan kiri | 2 | 50 | 2,4 | < 10 | + | 3 |
| 11 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 1 | 10 | Agenesis penis | - | - | 5 |
| 12 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 1 | 10 | 2 | < 10 | + | 2 |
| 13 | 20 | Scrotal | Kanan kiri tidak teraba di scrotum | - | - | 6 | < 10 | + | 3 |
| 14 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 3 / 2 | 90 | 3 | < 10 | + | 3 |
| 15 | 4 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | < 1 | < 10 | 3 | < 10 | + | 2 |
| 16 | 14 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 8 | 50 | 2 | < 10 | + | 2 |
| 17 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 1 | 10 | 3 | < 10 | + | 4 |
| 18 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 1,5 | 50 | 1,5 | < 10 | + | 5 |
| 19 | 3 | Perineal | Scrotal kanan kiri | < 1 | < 10 | 2 | < 10 | + | 4 |
| 20 | 24 | Perineal | Kanan kiri tidak teraba di scrotum | - | - | 0 | - | - | 6 |
| 21 | 39 | Penoscrotal | Scrotal kanan kiri | 3 | < 10 | < 1 | < 10 | + | 5 |
| 22 | 7 | Penoscrotal | Scrotal kanan kiri | 1 - 2 | < 10 | 3 | < 10 | + | 2 |
| 23 | 1 | Scrotal | Scrotal kanan kiri | 2 | 50 | 1 | < 10 | + | 1 |
| 24 | 8 bulan | Scrotal | Kanan kiri tidak teraba di scrotum | - | - | 2,5 | 10 | + | 3 |

Tabel 5. Distribusi karakteristik sampel berdasarkan derajat hipospadia

| No. | Derajat hipospadia | Jumlah | Persentase |
|--------|--------------------|--------|------------|
| 1 | Penoscrotal | 4 | 16,67 |
| 2 | Scrotal | 16 | 66,67 |
| 3 | Perineal | 4 | 16,67 |
| Jumlah | | 24 | 100 |

Tabel 6. Distribusi karakteristik sampel berdasarkan lokasi gonad

| No. | Gonad | Jumlah | Persentase |
|-----|-------------------------------------|--------|------------|
| 1. | Teraba pada scrotum bilateral | 17 | 70.83 |
| 2. | Teraba pada scrotum unilateral | 4 | 16.67 |
| 3. | Tidak teraba pada scrotum bilateral | 3 | 12.50 |

Sampel dengan gonad yang teraba pada *scrotum* bilateral, 19,05% (4 sampel) mempunyai volume kurang dari 10 persentil dan lainnya lebih dari 10 persentil (80,95%). Rata-rata panjang *phallus* adalah 2,61 cm dengan *phallus* terpendek kurang dari 1 cm dan terpanjang 6 cm. Panjang *phallus* ini sebagian besar tidak bersesuaian dengan usia sampel (95,65% kurang dari 10 persentil). Sampel dengan *phallus* terpanjang berusia 20 tahun, tetapi ukuran *phallus* untuk sampel ini kurang dari ukuran normal untuk individu dewasa. Satu sampel didapatkan dengan agensis penis.

Distribusi karakteristik klinis sampel penelitian berdasarkan *Quigley stage* adalah sebagai berikut.

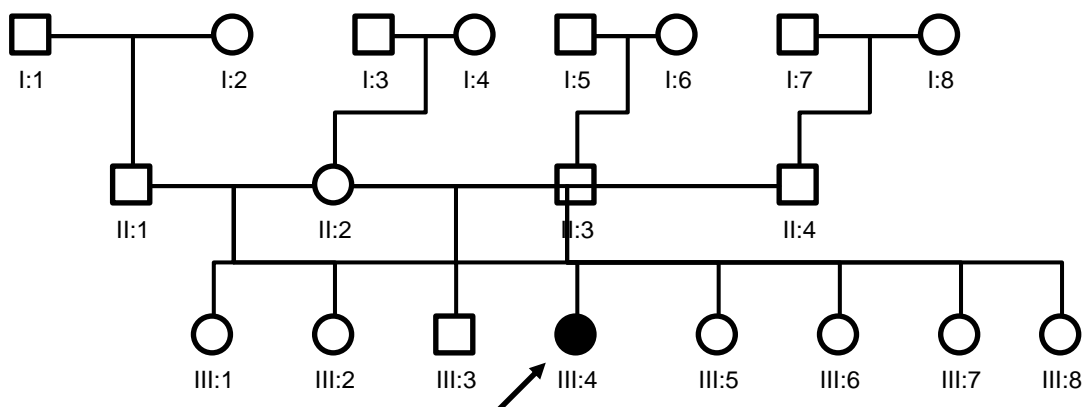
Tabel 7. Distribusi karakteristik klinis sampel berdasarkan *Quigley stage*

| <i>Quigley stage</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---|
| Jumlah | 3 | 4 | 10 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| (%) | (12,5%) | (16,67%) | (41,67%) | (12,5%) | (12,5%) | (4,16%) | |

Hasil kariotip pada sampel penelitian adalah :

- 22 sampel dengan 46, XY
- 1 sampel dengan 46,XY/45,X (22%)
- 1 sampel dengan 46, XY,dup (Ypter→q12)

Berdasarkan hasil kariotip didapatkan satu sampel dengan aberasi numerik dan satu sampel dengan aberasi struktur kromosom Y. Sampel yang mengalami aberasi struktur kromosom Y selanjutnya dianamnesis tentang silsilah dan riwayat kelainan yang sama dalam keluarga sehingga diperoleh gambaran *pedigree* sebagai berikut.



Keterangan:

- | | | | |
|---|--------------------|---|-------------------------------------|
| □ | : laki-laki normal | ● | : penderita |
| ○ | : perempuan normal | ↗ | : tanda panah menunjukkan penderita |

Gambar 5. *Pedigree* sampel dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y

Laki-laki normal yang diambil sebagai kontrol penelitian berjumlah 24 orang. Usia kontrol berkisar antara 26 tahun sampai dengan 50 tahun. Hasil kariotip pada kontrol penelitian tersebut adalah :

- 23 kontrol dengan 46, XY
- 1 kontrol dengan 46,XY/47,XXY (12%)

Berdasarkan hasil kariotip pada kontrol didapatkan satu orang dengan kariotip mengandung aberasi numerik yaitu penambahan satu kromosom X pada sebagian galur selnya. Berdasarkan temuan ini dilakukan anamnesis lanjutan terhadap kontrol sehingga didapatkan gambaran *pedigree* sebagai berikut.

Gambar 6. *Pedigree* kontrol dengan kariotip 46,XY/47,XXY (12%)

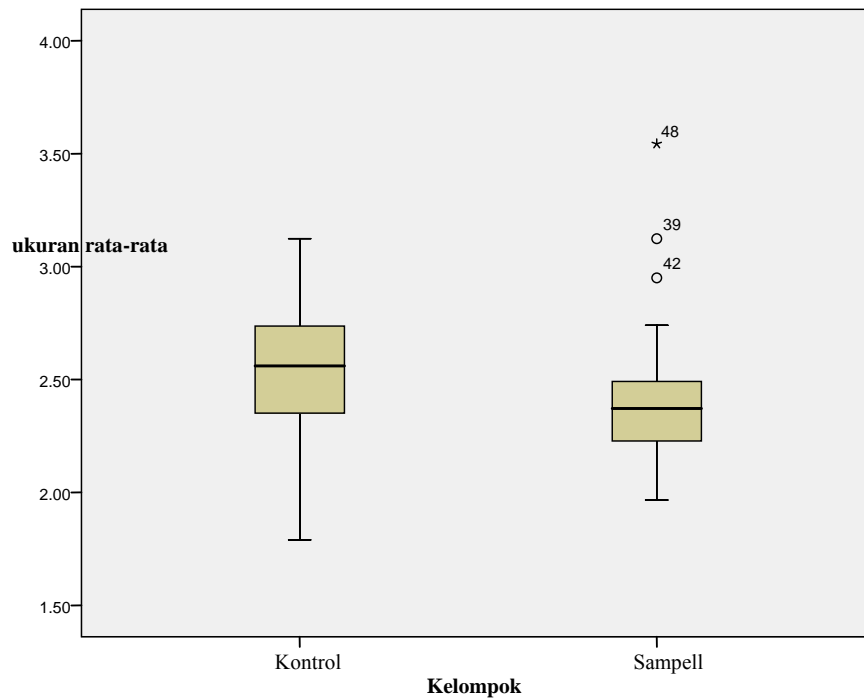
Panjang rata-rata kromosom Y untuk sampel adalah 2,43 μ m (SD : 0,35).

Panjang rata-rata kromosom Y untuk kontrol adalah 2,54 μ m (SD : 0,31). Data hasil pengukuran adalah sebagai berikut.

Tabel 8. Panjang rata-rata kromosom Y pada sampel dan kontrol

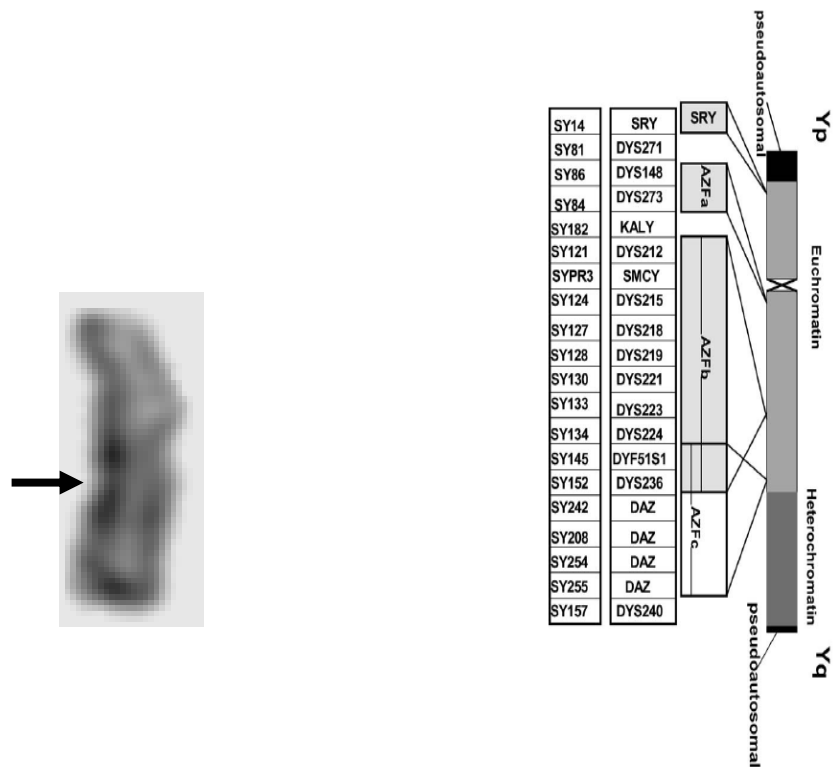
| No. | Sampel | | | | Kontrol | | | |
|-----|---------------------|-------------------------------|---------------|------|------------------------|-------------------------------|---------------|------|
| | Kariotip | Panjang kromosom Y (μ m) | | | Kariotip | Panjang kromosom Y (μ m) | | |
| 1 | 46,XY | 2.18 | | | 46,XY | 2,94 | | |
| 2 | 46,XY | 2.25 | | | 46,XY | 2,74 | | |
| 3 | 46,XY | 2.24 | | | 46,XY | 3,12 | | |
| 4 | 46,XY | 2.56 | | | 46,XY | 2,59 | | |
| 5 | 46,XY | 2.39 | | | 46,XY | 2,84 | | |
| 6 | 46,XY/45,X (22%) | 2.31 | | | 46,XY | 2,56 | | |
| 7 | 46,XY | 2.14 | | | 46,XY | 2,77 | | |
| 8 | 46,XY | 1.97 | | | 46,XY | 1,99 | | |
| 9 | 46,XY | 2.42 | | | 46,XY | 2,46 | | |
| 10 | 46,XY | 2.24 | | | 46,XY | 1,79 | | |
| 11 | 46,XY | 2.35 | | | 46,XY/47, XXY (12%) | 2,32 | | |
| 12 | 46,XY | 2.49 | | | 46,XY | 2,14 | | |
| 13 | 46,XY, dup(Y) | 3.54 | | | 46,XY | 2,95 | | |
| 14 | 46,XY | 2.45 | | | 46,XY | 2,63 | | |
| 15 | 46,XY | 3.12 | | | 46,XY | 2,70 | | |
| 16 | 46,XY | 2.21 | | | 46,XY | 2,25 | | |
| 17 | 46,XY | 2.35 | | | 46,XY | 2,49 | | |
| 18 | 46,XY | 2.95 | | | 46,XY | 2,25 | | |
| 19 | 46,XY | 2.35 | | | 46,XY | 3,21 | | |
| 20 | 46,XY | 1.96 | | | 46,XY | 2,25 | | |
| 21 | 46,XY | 2.00 | | | 46,XY | 2,21 | | |
| 22 | 46,XY | 2.49 | | | 46,XY | 3,13 | | |
| 23 | 46,XY | 2.03 | | | 46,XY | 2,49 | | |
| 24 | 46,XY | 2.42 | | | 46,XY | 2,42 | | |
| N | Minimum | Maksi- mum | Rata- rata | SD | Minimum | Maksi- mum | Rata- rata | SD |
| 24 | 1,97 | 3,54 | 2,43 | 0,35 | 1,79 | 3,12 | 2,54 | 0,31 |

Hasil uji beda panjang kromosom Y antara sampel dan kontrol penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna ($p > 0,05$) . Hasil uji tersebut dapat dilihat pada gambar berikut (hasil tes statistik selengkapnya terlampir).



Gambar 7. Hasil tes statistik perbedaan panjang kromosom Y antara sampel dan kontrol penelitian

Hasil analisis kromosom dengan teknik pewarnaan *C-banding* memperlihatkan hasil yang sama dengan teknik *G-banding*. Kromosom Y pada 22 sampel dengan kariotip 46,XY dan sampel dengan kariotip 46,XY/45,X menunjukkan *c-band positive*, yang berarti regio heterokromatin tercatat gelap dan berada pada bagian ujung lengan panjang kromosom Y. Hanya ditemukan satu sampel dengan aberasi struktur kromosom Y berupa duplikasi (46, XY,dup (Ypter→q12)) (gambar 8 dan 9). Hasil ini telah dikonfirmasi dengan teknik FISH di laboratorium *Postnatal Cytogenetic Department of Human Genetics Radboud University Nijmegen Medical Centre*, Belanda dan didapatkan hasilnya adalah 46,X, idic(Y)(pter→q12::q12→pter). Berikut gambar-gambar hasil pemeriksaan sitogenetik pada sampel ini.



Gambar 8. Kromosom Y dengan aberasi struktur (dari metafase dengan teknik pewarnaan *G-banding*) (gambar kiri, tanda panah menunjukkan *double heterochromatin* pada kromosom Y), idiogram kromosom Y normal (gambar kanan)



Gambar 9. Aberasi struktur kromosom Y pada metafase dengan pewarnaan *C-banding* untuk identifikasi heterokromatin (tanda panah menunjukkan *double heterochromatin* pada kromosom Y)

4. 2 Pembahasan

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian ambigus genitalia di lingkup Pusat Riset Biomedik FK UNDIP dan RSUP Dr. Kariadi Semarang. Pemeriksaan fisik genital eksternal dan internal, hormon seksual serta pemeriksaan gonad sudah dilakukan oleh Tim Penyesuaian Kelamin RSUP DR.Kariadi dan FK UNDIP, sehingga penelitian ini hanya melakukan eksplorasi lebih jauh dalam pemeriksaan sitogenetik yaitu dengan fokus pada kromosom Y penderita.

Analisis struktur kromosom Y dilakukan pada metafase yang memenuhi kriteria *banding level 550* berdasarkan indikator kualitas *banding* ISCN (contoh metafase dengan *banding level 550* terlampir). Sejumlah kesulitan dalam

mencapai kualitas ini menyebabkan rentang waktu pengambilan sampel yang semula direncanakan dari Februari 2007 – Februari 2008 menjadi hingga Mei 2008. Sejumlah kesulitan pencapaian kualitas ini adalah perlakuan pada saat kultur darah untuk preparasi kromosom, preparasi kromosom yang telah lama dilakukan (memakai sampel lama), dan keterampilan peneliti.

Berdasarkan hasil pemeriksaan sitogenetik dengan teknik *G-banding*, 22 sampel dengan kariotip normal 46,XY dan satu sampel aberasi numerik kromosom kelamin serta satu sampel dengan aberasi struktur kromosom Y. Karakteristik klinis sampel penelitian dengan kariotip normal berdasarkan *Quigley stage* bervariasi dari *stage* 1 sampai dengan 6, dengan karakteristik terbanyak pada *stage* 3. Sampel dengan aberasi numerik memiliki karakteristik klinik sesuai *Quigley stage* 1 dan sampel dengan aberasi struktur pada *stage* 3.

Analisis struktur kromosom Y dilakukan dengan teknik pewarnaan *C-banding* yang merupakan teknik primer untuk mengidentifikasi variasi polimorfisme kromosom, seperti untuk memeriksa adanya penambahan atau pengurangan panjang regio heterokromatin pada kromosom 1qh, 9qh, 16qh, dan Yqh.²³ Berdasarkan analisis struktur dengan teknik ini, didapatkan 22 sampel dengan kariotip 46,XY seluruhnya memiliki *C-band positive* yang berarti regio heterokromatin tercatat gelap dan berada pada ujung lengan panjang kromosom Y. Aberasi struktur berupa inversi kromosom Y tidak didapatkan pada 22 sampel, ditunjukkan dengan tidak adanya regio heterokromatin yang bergeser dari lokasi tersebut. Demikian pula pada sampel dengan kariotip 46,XY/45,X(22%), kromosom Y pada metafase yang mengandung kromosom Y, tampak memiliki *C-*

band positive dan tidak memperlihatkan adanya suatu aberasi struktur kromosom Y.

Kariotip mosaik 46,XY/45,X dapat terjadi karena *postzigotic nondisjunction* yaitu kegagalan pembelahan kromosom homolog dari kromosom seks zigot normal pada mitosis masa embrio awal. Hal ini menyebabkan sebagian galur sel pada individu normal 46,XY dan sebagian dengan *monosomy* 45,X. Sejumlah penelitian yang melaporkan kasus-kasus mosaik 46,XY/45,X, menyebutkan adanya fenotip genital yang abnormal oleh karena pengaruh gen SRY pada kromosom Y yang abnormal. Sejumlah kasus tersebut ditemukan dengan *point mutation* gen SRY.³⁵ Fenotip genitalia dapat berupa berbagai tingkat maskulinisasi mulai dari kliteromegali, hipospadia dan *cryptorchidism*.³⁸

Pemeriksaan dengan teknik *C-banding*, didapatkan satu sampel dengan aberasi struktur kromosom Y yaitu duplikasi kromosom Y yang ditunjukkan dengan bergesernya regio heterokromatin ke bagian tengah kromosom. Temuan ini telah dikonfirmasi dengan pemeriksaan FISH dan hasilnya adalah 46,X, idic(Y) (pter→q12::q12→pter).²¹

Aberasi struktur kromosom Y berupa isodisentrik kromosom Y, berarti bahwa individu tersebut hampir memiliki 2 kromosom Y utuh yang saling melekat dekat ujung lengan panjang keduanya.²¹ Isodisentrik kromosom Y adalah bentuk aberasi struktur kromosom Y yang paling sering ditemui.^{15,16,17} Mekanisme utama terjadinya aberasi struktur ini diduga karena adanya pembelahan isokromatid diikuti dengan *U-type exchange*, yaitu penggantian basa nitrogen Cytosin penyusun struktur DNA dengan basa nitrogen Urasil yang dapat menyebabkan

patahnya struktur DNA.¹⁶ Hal ini dapat terjadi saat meiosis pada ayah (spermatogenesis) sehingga kemungkinan seluruh sel pada sampel ini membawa kromosom Y yang mengalami aberasi.¹⁶

Jika lokasi membelahnya kromatid pada lengan pendek kromosom maka terjadi duplikasi seluruh lengan panjang disertai sebagian lengan pendek kromosom tersebut. Sedangkan, jika lokasi membelahnya pada lengan panjang maka duplikasi yang terjadi meliputi seluruh lengan pendek disertai sebagian lengan panjang kromosom tersebut.^{16,39} Sebagian besar kasus *idic(Y) chromosomes* berupa 2 lengan pendek dengan sebagian kecil lengan panjang di antaranya atau 2 lengan panjang dengan sebagian kecil lengan pendek.¹⁶ Jadi, tidak seperti pada sampel ini, yaitu duplikasi 2 kromosom Y yang hampir utuh. Keadaan duplikasi kromosom Y yang saling melekat dekat ujung lengan panjang masing-masing kromosom ini, menimbulkan kemungkinan adanya delesi segmen pada masing-masing lengan panjang kromosom tersebut. Maka perlu pemeriksaan FISH dengan *probe* gen-gen pada lengan panjang kromosom Y (gen AZFa, AZFb, AZFc) atau PCR pada regio tersebut sehingga akan sangat membantu dalam diagnosis aberasi kromosom Y lengan panjang. Hasil pemeriksaan tersebut selanjutnya akan membantu untuk memahami fenotip dan klinik pada sampel.

Gen-gen pada regio eukromatik lengan panjang kromosom Y (Yq11) diperlukan pada proses spermatogenesis normal. Mikrodelesi lengan panjang kromosom Y adalah penyebab genetik yang penting pada testikulopati primer karena adanya 3 regio faktor azoospermia (gen AZFa, AZFb, dan AZFc).^{9,10}

Fenotip yang dihasilkan sangat tergantung pada bentuk struktur disentrik kromosom Y, proporsi galur sel yang terbentuk (tipe mosaiknya) dan lokasi patahnya kromosom¹⁶. Sebuah penelitian pada 9 kasus dengan kariotip yang mengandung isodisentrik kromosom Y, memperlihatkan fenotip yang sangat bervariasi, yaitu 75-80% penderita memiliki tubuh yang pendek dan 65-75% dengan ambiguitas seksual.¹⁶

Kondisi kromosom Y dengan aberasi struktur yang bersifat tidak stabil dan dapat hilang dalam siklus pembelahan sel, memungkinkan terjadinya keadaan mosaik galur sel 45,X dengan aberasi kromosom Y.^{16,36} Hal ini dapat terjadi akibat *mitotic rearrangement* (pembelahan mitosis pada meiosis I).³⁹ Oleh karena itu pada sebagian besar kasus dengan disentrik kromosom Y memiliki kariotip mosaik, umumnya dengan galur sel 45, X. Tetapi, pada sampel dalam penelitian ini tidak ditemukan galur sel 45,X dalam limfosit darah tepi, kemungkinan dapat ditemukan galur sel ini pada jaringan lainnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemeriksaan kultur jaringan fibroblas untuk melihat apakah terdapat galur sel 45,X, sehingga juga dapat menjelaskan fenotip yang ditemukan pada sampel ini.³⁶

Kasus dengan kariotip 45,X/47,XYY sangat jarang ditemukan, dan fenotip yang dapat ditemui bervariasi antara laki-laki normal hingga wanita dengan berbagai tingkat ambigu genitalia.^{15,38,39} Galur sel 45,X dapat menyebabkan munculnya fenotip seperti pada kasus dengan sindrom Turner. Salah satu fenotip berupa tubuh pendek dapat terjadi karena hilangnya satu alel gen SHOX (gen *short stature homeobox*) yang berlokasi pada PAR 1 (*pseudoautosomal region 1*) lengan pendek kromosom X dan Y yang merupakan

penyebab utama *short stature* pada sindrom Turner. Mekanisme terjadinya keadaan ini karena gen SHOX berperan dalam perkembangan tulang selama masa janin, sehingga defisiensi gen ini (haploinsufisiensi) menyebabkan disorganisasi proliferasi *chondrocyte*.^{40,41}

Sejumlah kasus lain yang pernah dilaporkan, menyebutkan adanya kasus mosaik 45,X/47,XYY dengan fenotip individu yang berkembang sebagai laki-laki normal.¹⁵ Hal ini menunjukkan adanya pengaruh proporsi sel yang mengandung isodisentrik Yp terhadap fenotip seks individu karier. Sebuah penelitian terhadap subyek dengan mosaik isodisentrik Yp dengan fenotipik laki-laki dan fenotipik perempuan, didapatkan proporsi sel dengan isodisentrik Yp dalam darah tepi pada subyek fenotipik laki-laki lebih banyak (36%) daripada subyek dengan fenotipik perempuan (8%).¹⁶

Fenotip bervariasi yang mungkin ditemukan merupakan hal yang harus dipertimbangkan dalam konseling genetik, khususnya untuk penentuan jenis kelamin. Sehingga, pada kasus seperti ini memerlukan pemeriksaan yang teliti, mengingat bahwa jenis kelamin, baik laki-laki maupun perempuan, disebut sempurna apabila paling tidak memenuhi 10 kriteria, 6 kriteria biologis dan 4 kriteria psikologis. Kriteria biologis meliputi : susunan kromosom, jenis gonad, bentuk alat kelamin luar, alat kelamin dalam, hormon seks, dan tanda kelamin sekunder. Persyaratan psikologis meliputi : identitas seksual, identitas jender, orientasi seksual, dan perilaku seksual.⁴² Hal lain yang penting dalam konseling genetik adalah penjelasan pada keluarga tentang risiko berulangnya kelainan ini pada keturunan berikutnya (*recurrence risk*). Sejumlah literatur menyebutkan

bahwa risiko berulang kelainan ini bagi orang tua dari anak dengan 47,XYY adalah rendah, yaitu $< 1\%$.⁴³ Berdasarkan data hasil anamnesis pada sampel ini (*pedigree* sampel, gambar 5), diketahui bahwa tidak ada anggota keluarga lainnya yang memiliki kelainan serupa.

Karakteristik klinik sampel dengan aberasi struktur yang termasuk *Quigley stage 3*, menunjukkan bahwa fenotip sampel ini tidak berbeda jauh dengan sampel lainnya. Sebagaimana telah disebutkan sebelumnya, sampel yang berkariotip normal memiliki karakteristik bervariasi antara *Quigley stage 1* sampai 6 dengan karakteristik terbanyak pada *Quigley stage 3* dan pada sampel dengan aberasi numerik termasuk *Quigley stage 1*. Hal ini bisa diperkirakan karena bagian kromosom Y yang berperan dalam diferensiasi seksual dan secara tidak langsung mempengaruhi fenotip genitalia eksterna adalah pada lengan pendek kromosom Y yang mengandung gen SRY. Sedangkan, segmen yang mengalami duplikasi dan kemungkinan mengalami delesi akibat duplikasi ini adalah bagian lengan panjang dari 2 kromosom Y.

Kemungkinan-kemungkinan fenotip pada kasus dengan aberasi struktur kromosom Y dari berbagai literatur yang tersebut di atas, menunjukkan bahwa fenotip pada kasus ini dapat bervariasi. Oleh karena itu pada kasus dengan aberasi struktur kromosom Y perlu pemeriksaan fisik yang lebih lengkap, pemeriksaan sitogenetik dan pemeriksaan secara molekuler.

Abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia dalam penelitian ini selain diperiksa berdasarkan adanya aberasi struktur, juga dilakukan dengan menganalisis ada atau tidaknya perbedaan panjang kromosom Y antara

sampel dengan kontrol penelitian. Dasar pemikiran dalam pengambilan kontrol penelitian dari populasi laki-laki normal adalah karena pada lengan panjang kromosom Y terdapat gen penentu infertilitas. Sehingga diperkirakan pada laki-laki yang telah berkeluarga dan tidak mempunyai riwayat infertilitas (mempunyai anak), memiliki kromosom Y yang normal. Berdasarkan hasil pemeriksaan sitogenetik, 23 kontrol mempunyai kariotip 46,XY dan 1 kontrol dengan mosaik 46,XY/47,XXY(12%). Kontrol dengan kariotip mosaik tetap diambil karena aberasi numerik yang terjadi berupa penambahan kromosom X pada sebagian galur selnya bukan kromosom Y.

Kontrol dengan kariotip mosaik 46,XY/47,XXY(12%), secara khusus perlu diperiksa lebih lanjut dan diberi konseling genetik. Individu dewasa dengan kariotip mosaik 46,XY/47,XXY kemungkinan memiliki testis yang kecil dan mengalami infertilitas.⁴⁴ Konseling genetik yang perlu diberikan adalah mengenai mekanisme terjadinya kariotip mosaik dan risiko berulangnya kelainan ini pada keturunan berikutnya. Kariotip mosaik 46,XY/47,XXY dapat terjadi karena kesalahan membelah (*non disjunction*) mitosis pada masa pembentukan zigot (*postzigotic*),^{39,44} artinya gamet dari orang tua telah terbentuk normal kemudian terjadi kegagalan pembelahan yang menyebabkan sebagian galur sel 46,XY dan galur sel lainnya dengan 47,XXY atau 45,Y yang bersifat *lethal*. Kemungkinan hasil gametogenesis pada kontrol ini dapat menyebabkan abortus pada kehamilan berikutnya jika zigot yang terbentuk memiliki kariotip yang tidak memungkinkan janin dapat berkembang, atau janin dengan seluruh galur selnya mengandung penambahan kromosom X (kariotip 47,XXY) yang kemungkinan akan

berkembang sebagai individu dengan sindrom Klinefelter.⁴⁴ *Recurrence risk* bagi orang tua dari individu dengan kariotip mosaik ini untuk memperoleh anak dengan kelainan serupa adalah rendah, yaitu $< 1\%$.⁴³ Berdasarkan anamnesis yang dilakukan lebih lanjut terhadap kontrol ini, diperoleh gambaran *pedigree* (gambar 6) yang menunjukkan tidak ada anggota keluarga lain di pihak kontrol yang memiliki riwayat abortus berulang yang mungkin disebabkan oleh suatu kelainan kromosom atau keterbelakangan mental yang sering menyertai individu dengan kariotip yang mengandung penambahan kromosom X. Hanya saja pada kontrol terdapat riwayat 2 kali abortus di antara keturunannya. Riwayat dua kali abortus spontan ini bisa berarti terdapat kemungkinan proporsi mosaik 46,XY dengan galur sel 47,XXY dalam persentase yang lebih besar di gonad, yaitu lebih dari 12% yang ditemukan pada sel somatik kontrol ini.

Panjang rata-rata kromosom Y sampel adalah 2,43 μm (SD: 0,35) dan pada kontrol adalah 2,54 (SD: 0,31). Hasil tes statistik menunjukkan panjang kromosom Y antara sampel dan kontrol ini tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Sampel dengan aberasi struktur memiliki panjang kromosom Y yang lebih dari yang lain, walaupun kemudian dapat dipahami bahwa panjangnya kromosom ini akibat adanya duplikasi 2 kromosom Y yang hampir utuh. Hasil ini dapat menunjukkan bahwa panjang kromosom Y tidak berpengaruh terhadap fenotip penderita ambigu genitalia.

Berdasarkan penelitian terdahulu, telah diketahui bahwa ukuran panjang kromosom Y berbeda di antara berbagai populasi.⁴⁵ Sedangkan, sampel dalam penelitian ini tidak ditentukan secara khusus berdasarkan suku atau populasinya,

hanya mewakili populasi dengan ambigu genitalia. Berdasarkan hal ini perlu dilakukan penelitian dengan sampel yang dibatasi berdasarkan etnis, sehingga dapat diketahui ada atau tidaknya perbedaan ini di antara populasi yang berbeda.

Meskipun tidak ada perbedaan bermakna dalam ukuran panjang kromosom Y antara sampel dengan kontrol orang normal, hal ini tidak menyingkirkan kemungkinan adanya mutasi genetik yang memungkinkan terjadinya fenotip yang berbeda. Salah satu gen pada kromosom Y yaitu gen SRY hanya berukuran 35-kbp, sedangkan pemeriksaan sitogenetik hanya dapat mendeteksi abnormalitas yang berukuran lebih dari atau sama dengan 4 Mb. Hal ini sekaligus menekankan pentingnya pemeriksaan molekuler untuk mengetahui adanya mutasi genetik.

Pada penelitian ini, tidak dilakukan pengukuran panjang regio heterokromatin lengan panjang kromosom Y karena keterbatasan sarana untuk melakukan pengukuran tersebut. Laporan sejumlah penelitian terdahulu menyebutkan bahwa panjang regio heterokromatin lengan panjang kromosom Y di antara berbagai populasi berbeda-beda. Panjang regio heterokromatin ini dinyatakan sebagai $Y_{qh} +$ (positif) atau $Y_{qh} -$ (negatif) atau *C-band positive* dan *C-band negative*.⁴⁵ Sebuah laporan penelitian juga menyebutkan adanya satu individu dengan panjang regio heterokromatin yang berbeda dalam 2 populasi selnya, yaitu *Y_{qh} positive* dan *Y_{qh} negative*. Hasil ini diperoleh dengan memeriksa kromosom pada 30 metafase berbeda dari 2 media kultur yang berbeda.⁴⁵ Pada penelitian ini, analisis struktur kromosom Y dilakukan pada 8

metafase berbeda, tetapi secara kualitatif tidak ditemukan perbedaan panjang regio heterokromatin kromosom Y antar metafase yang berbeda.

Hasil penelitian ini menunjukkan pentingnya pemeriksaan sitogenetik pada penderita ambigu genitalia, tetapi adanya abnormalitas kromosom Y berupa aberasi struktur dan panjang kromosom Y tidak secara langsung berpengaruh terhadap fenotip penderita. Keterbatasan penelitian ini dalam pengukuran panjang kromosom Y yang tidak berdasarkan perbedaan etnis sampel dan kontrol mungkin berpengaruh pada hasil penelitian. Berdasarkan hal ini, agar pengukuran panjang kromosom Y dapat diafllikasikan pada populasi penderita ambigu genitalia dan laki-laki normal, perlu dilakukan penelitian panjang kromosom Y dengan membatasi populasi sampel dan kontrol berdasarkan etnis sehingga dapat diketahui adanya perbedaan panjang kromosom Y antar populasi ambigu genitalia khususnya serta antar populasi etnis di Indonesia pada umumnya.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Penderita ambigu genitalia berjumlah 24 orang, didapatkan 1 orang dengan abnormalitas kromosom Y berupa aberasi struktur .
- 5.1.2 Perbandingan panjang kromosom Y antara penderita ambigu genitalia dengan laki-laki normal menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna.
- 5.1.3 Fenotip penderita ambigu genitalia dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y bervariasi, pada penderita dalam penelitian ini termasuk dalam kriteria *Quigley stage 3*.

5.2 Saran

- 5.2.1 Pemeriksaan kromosom dengan kultur dari jaringan fibroblas perlu dilakukan untuk mengetahui adanya galur sel 45,X pada penderita dengan aberasi struktur berupa duplikasi kromosom Y.
- 5.2.2 Pemeriksaan gen SRY dan AZF perlu dilakukan pada penderita dengan aberasi struktur kromosom Y untuk membantu dalam konseling genetika.
- 5.2.3 Penelitian panjang kromosom Y pada laki-laki normal dan penderita ambigu genitalia perlu dilakukan dengan membatasi populasi laki-laki normal dan penderita ambigu genitalia berdasarkan etnis agar dapat mengetahui adanya perbedaan panjang kromosom Y antar populasi

ambigus genitalia khususnya serta antar populasi etnis di Indonesia pada umumnya.

- 5.2.4 Fenotip penderita ambigus genitalia dengan kariotip mengandung aberasi struktur kromosom Y yang bervariasi menunjukkan perlunya pemeriksaan yang lebih lengkap untuk keperluan konseling genetik.
- 5.2.5 Laki-laki normal pada kontrol tanpa riwayat infertilitas yang didapatkan dengan kariotip mengandung aberasi numerik kromosom kelamin, menunjukkan perlunya perhatian pada keluarga dengan riwayat abortus berulang yang mungkin disebabkan oleh kelainan kromosom.

BAB 6

RINGKASAN

Ambigus genitalia adalah suatu kelainan yang ditandai dengan adanya organ genitalia eksterna yang tidak jelas laki-laki atau perempuan, atau mempunyai gambaran kedua jenis kelamin. Kelainan ini masih belum banyak diteliti di Indonesia. Sejumlah penelitian menunjukkan angka kejadian yang terus meningkat, yaitu antara 1 dari 4500 sampai dengan 1 dari 1000-2000 bayi lahir hidup. Di Indonesia sendiri belum banyak data yang menunjukkan angka kejadian ambigus genitalia.

Secara normal perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan merupakan proses yang sangat kompleks. Perkembangan prenatal organ genital memerlukan peran krusial dari kromosom Y. Sehingga struktur kromosom Y diduga mempunyai pengaruh terhadap fenotip seks secara tidak langsung. Hal ini dapat dipahami oleh karena kromosom Y mengandung lokus krusial untuk diferensiasi seksual.

Sejumlah penelitian menunjukkan adanya aberasi struktur kromosom pada penderita ambigus genitalia. Sejumlah penelitian melaporkan adanya inversi parasentrik, disentrik dan isodisentrik kromosom Y pada penderita ambigus genitalia. Demikian pula di Indonesia, telah dilaporkan sebuah kasus ambigus genitalia di Semarang dengan *ring chromosome Y*.

Pemeriksaan sitogenetik pada penderita ambigus genitalia di Indonesia masih belum banyak dilakukan, termasuk penelitian ambigus genitalia dengan

konsentrasi pada profil sitogenetik kromosom Y penderita. Berdasarkan hal ini, maka dilakukan penelitian untuk mendapatkan gambaran abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.

Masalah yang dirumuskan secara umum adalah apakah terdapat abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia dan secara khusus adalah

- Apakah terdapat aberasi struktur kromosom Y pada penderita ambigu genitalia
- Apakah terdapat perbedaan ukuran kromosom Y pada penderita ambigu genitalia dengan orang normal
- Bagaimanakah gambaran fenotip penderita ambigu genitalia dengan kariotip yang mengandung aberasi struktur kromosom Y

Manfaat yang diharapkan untuk ilmu pengetahuan yaitu menambah khasanah pengetahuan tentang berbagai abnormalitas kromosom yang mendasari suatu kelainan genetik seperti ambigu genitalia serta sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya mengenai ambigu genitalia. Manfaat untuk pelayanan kesehatan yaitu memberikan informasi yang berguna bagi praktisi kedokteran tentang pentingnya pemeriksaan sitogenetik dalam pengelolaan penderita ambigu genitalia. Manfaat untuk masyarakat yaitu memberikan informasi tentang pemeriksaan sitogenetik yang dapat dilakukan jika ditemukan kelainan ambigu genitalia di antara masyarakat.

Tujuan penelitian secara umum adalah untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia, dan tujuan khusus adalah:

- Untuk mengetahui adanya aberasi struktur kromosom Y pada penderita ambigu genitalia.
- Untuk mengetahui adanya perbedaan ukuran kromosom Y pada penderita ambigu genitalia dengan orang normal
- Untuk mengetahui gambaran fenotip penderita ambigu genitalia dengan kariotip yang mengandung aberasi struktur kromosom Y.

Kromosom Y adalah kromosom terkecil pada manusia yang diperlukan untuk perkembangan seksual dan spermatogenesis. Kromosom Y sangat sedikit mengandung gen aktif dan sebagian besar strukturnya terdiri atas heterokromatin.

Setengah dari lengan panjang kromosom Y bersifat *C-band positive* dan pada manusia regio ini bersifat sangat polimorfik. Sebuah penelitian pada beberapa kelompok ras melaporkan tentang ukuran kromosom Y yang bervariasi di antara berbagai individu dan populasi etnik yang berbeda. Sebuah literatur menyebutkan estimasi rata-rata ukuran kromosom Y adalah 60Mb. Kromosom Y yang merupakan penentu kelamin pada manusia, mengandung 58 juta pasang basa dan merupakan 0,38% dari total DNA dalam sel.

Perkembangan prenatal organ genital laki-laki dan perempuan secara normal merupakan proses yang sangat kompleks. Jenis kelamin ditentukan oleh tiga faktor utama, yaitu faktor kromosom, faktor gonad dan faktor hormonal. Penentuan fenotip seks dimulai dari seks genetik yang kemudian diikuti oleh suatu

kaskade, yaitu kromosom seks menentukan jenis gonad, gonad menentukan diferensiasi/regresi duktus internal (*mülleri* dan *wolfii*). Determinasi gonad indeferen menjadi testis dalam bulan kedua kehidupan fetus ini dipandu oleh informasi genetik yang ada pada lengan pendek kromosom Y (Y p11.3), yaitu pada area yang disebut area penentu seks pada kromosom Y yang mengandung gen SRY.

Gangguan dalam proses perkembangan prenatal organ genital dapat menimbulkan ambigu genitalia. Kelainan ini dapat disebabkan oleh kelainan kromosom (genetik), kelainan hormonal, defisiensi enzim, dan kelainan lain yang sampai saat ini belum dapat dijelaskan, berasal dari jaringan fetus.

Kelainan kromosom dapat menimbulkan masalah fungsional pada berbagai organ dan seringkali berhubungan dengan kesulitan dalam penentuan jenis kelamin pada beberapa kasus ambigu genitalia. Struktur kromosom Y diduga mempunyai pengaruh terhadap fenotip seks secara tidak langsung. Aberasi struktural kromosom Y pada penderita ambigu genitalia yang pernah dilaporkan adalah kromosom cincin, disentrik, isodisentrik lengan pendek kromosom Y, dan delesi sebagian besar lengan panjang kromosom Y. Ukuran kromosom Y pada berbagai variasi fenotip ambigu genitalia bervariasi. Beberapa penelitian terdahulu telah menjelaskan tingginya temuan polimorfisme struktural kromosom Y yang dapat dilihat secara sitogenetik berdasarkan variasi panjang regio eukromatin dan heterokromatin kromosom Y.

Penelitian ini bersifat deskriptif analitik untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigu genitalia. Abnormalitas

kromosom Y dideskripsikan berdasarkan ada atau tidaknya aberasi struktur kromosom Y dan dilakukan analisis terhadap perbedaan panjang kromosom Y antara penderita ambigu genitalia dengan laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dilakukan dari bulan September 2007 sampai dengan Agustus 2008.

Populasi terjangkau adalah pasien ambigu genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan sampel berjumlah 24 orang yang diambil dengan cara *consecutive random samplings*. Kriteria inklusi sampel adalah sebagai berikut:

- Pasien-pasien yang secara fisik memenuhi kriteria sebagai penderita ambigu genitalia oleh tim penyesuaian kelamin RSUP Dr. Kariadi dan FK UNDIP. Kriteria tersebut meliputi:
 - Pasien dengan kelainan genitalia eksterna dan atau dengan hipospadia berat (*orifisium urethrae externum* terletak pada scrotum atau perineum)
 - Pada pemeriksaan klinis menunjukkan kelainan (hipo/hypervirilisasi, lokasi dan ukuran gonad)
- Pada pemeriksaan sitogenetik mengandung 1 kromosom Y
- Bersedia mengikuti penelitian yang dinyatakan dalam surat pernyataan

Kriteria Eksklusi yaitu penderita ambigu genitalia yang memiliki *multiple malformation*

Kontrol tanpa batasan umur diambil dari populasi laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik. Laki-laki normal yang dimaksud adalah laki-laki dewasa yang telah berkeluarga dan mempunyai anak. Dasar pengambilan populasi

ini sebagai kontrol adalah bahwa pada kromosom Y terdapat faktor penentu fertilitas (gen AZFa, AZFb, dan AZFc), maka berarti bahwa laki-laki dewasa yang telah berkeluarga dan mempunyai anak tidak mengalami kelainan pada gen ini sehingga memiliki kromosom Y yang normal secara struktural. Kontrol juga tidak dibatasi berdasarkan umur oleh karena dalam literatur tidak disebutkan bahwa panjang kromosom Y berbeda berdasarkan umur seorang laki-laki. Data hasil pengukuran panjang kromosom Y pada kontrol akan digunakan untuk perbandingan panjang kromosom Y dengan penderita ambigu genitalia. Kontrol diambil dari sejumlah mahasiswa S2 dan staf pada Pusat Riset Biomedik. Kontrol yang telah menyatakan bersedia, diminta data pribadinya dan ditanya tentang ada atau tidaknya riwayat infertilitas. Kontrol yang tidak memiliki riwayat infertilitas diambil dengan jumlah equal terhadap sampel, yaitu 24 orang.

Variabel Penelitian meliputi variabel terikat yaitu variasi fenotip ambigu genitalia dengan variabel bebas yaitu:

- aberasi struktur kromosom Y
- panjang kromosom Y

Abnormalitas kromosom Y yang diteliti adalah adanya aberasi struktur dan perbedaan panjang kromosom Y antara penderita ambigu genitalia dengan orang normal. Fenotip yang diamati adalah tanda fisik yang meliputi adanya kelainan genitalia eksterna dan atau dengan *hypospadia* berat (*orifisium urethrae externum* terletak pada scrotum atau perineum) disertai adanya tanda hipo/hipervirilisasi yang selanjutnya diklasifikasikan menurut *Quigley Stage*.

Penderita ambigus genitalia yang datang ke Pusat Riset Biomedik dalam periode penelitian, mula-mula diminta biodatanya dan membuat pernyataan setuju atau tidak setuju untuk dilibatkan dalam penelitian. Penderita tersebut selanjutnya diperiksa fisik genitalia eksternanya dan dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan sitogenetik. Penderita dengan hasil kariotip mengandung kromosom Y diambil sebagai sampel penelitian. Laki-laki normal yang datang ke Pusat Riset Biomedik juga diminta biodata dan mengisi surat pernyataan setuju atau tidak setuju untuk dilibatkan dalam penelitian ini. Mereka yang setuju untuk terlibat dalam penelitian ini selanjutnya ditanya tentang riwayat fertilitasnya. Mereka yang tidak memiliki riwayat infertilitas diambil sebagai kontrol dan dilakukan pemeriksaan sitogenetik. Hasil pemeriksaan sitogenetik dengan teknik pengecatan *G-banding* digunakan untuk analisis ada atau tidaknya aberasi struktur dan mengukur panjang kromosom Y. Analisis kemungkinan adanya aberasi struktur juga dilakukan dengan metafase hasil pengecatan *C-banding*. Berdasarkan data hasil pemeriksaan sitogenetik ini selanjutnya dibuat analisis data untuk mengetahui adanya abnormalitas kromosom Y pada penderita ambigus genitalia. Analisis data secara deskriptif dengan menggunakan program SPSS 15.0 untuk statistik deskriptif. Data panjang kromosom Y diuji normalitas distribusi datanya dengan tes Shapiro-Wilk. Berdasarkan hasil tes Shapiro-Wilk yang menunjukkan bahwa distribusi data tidak normal maka dilakukan uji dengan Mann- Withney.

Penderita yang memenuhi kriteria inklusi penelitian dan diambil sebagai sampel penelitian berjumlah 24 orang. Hasil kariotip pada sampel penelitian adalah :

- 22 sampel dengan 46, XY
- 1 sampel dengan 46,XY/45,X (22%)
- 1 sampel dengan 46, XY,dup (Ypter→q12)

Laki-laki normal yang diambil sebagai kontrol penelitian berjumlah 24 orang. Hasil kariotip pada kontrol penelitian adalah :

- 23 kontrol dengan 46, XY
- 1 kontrol dengan 46,XY/47,XXY (12%)

Panjang rata-rata kromosom Y untuk sampel adalah 2,43 μ m (SD : 0,35). Panjang rata-rata kromosom Y untuk kontrol adalah 2,54 μ m (SD : 0,31). Hasil uji beda panjang kromosom Y antara sampel dan kontrol penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

Hasil analisis kromosom dengan teknik pewarnaan *C-banding* memperlihatkan hasil yang sama dengan teknik *G-banding*. Kromosom Y pada 22 sampel dengan kariotip 46,XY dan sampel dengan kariotip 46,XY/45,X menunjukkan *c-band positive*, yang berarti regio heterokromatin tercat gelap dan berada pada bagian ujung lengan panjang kromosom Y. Aberasi struktur berupa inversi kromosom Y tidak didapatkan pada 22 sampel, ditunjukkan dengan tidak adanya regio heterokromatin yang bergeser dari lokasi tersebut. Sampel dengan kariotip 46,XY/45,X(22%) juga memperlihatkan hasil yang sama, kromosom Y pada metafase yang mengandung kromosom Y, tampak memiliki *C-band positive*

dan tidak memperlihatkan adanya suatu aberasi struktur kromosom Y. Pemeriksaan dengan teknik *C-banding* ini juga menunjukkan terdapatnya satu sampel dengan aberasi struktur kromosom Y yaitu duplikasi kromosom Y yang ditunjukkan dengan bergesernya regio heterokromatin ke bagian tengah kromosom. Temuan ini telah dikonfirmasi dengan pemeriksaan FISH dan hasilnya adalah 46,X, idic(Y) (pter→q12::q12→pter).

Aberasi struktur kromosom Y berupa isodisentrik kromosom Y, berarti bahwa individu tersebut hampir memiliki 2 kromosom Y utuh yang saling melekat dekat ujung lengan panjang keduanya. Isodisentrik kromosom Y adalah bentuk aberasi struktur kromosom Y yang paling sering ditemukan. Mekanisme utama terjadinya aberasi struktur ini diduga karena adanya pembelahan isokromatid diikuti dengan *U-type exchange*, yaitu penggantian basa nitrogen Cytosin penyusun struktur DNA dengan basa nitrogen Urasil yang dapat menyebabkan patahnya struktur DNA. Hal ini dapat terjadi saat meiosis pada ayah (spermatogenesis) sehingga kemungkinan seluruh sel pada sampel ini membawa kromosom Y yang mengalami aberasi.

Fenotip yang dihasilkan sangat tergantung pada bentuk struktur disentrik kromosom Y, proporsi galur sel yang terbentuk (tipe mosaiknya) dan lokasi patahnya kromosom. Sebuah penelitian pada 9 kasus dengan kariotip yang mengandung isodisentrik kromosom Y, memperlihatkan fenotip yang sangat bervariasi, yaitu 75-80% penderita memiliki tubuh yang pendek dan 65-75% dengan ambiguitas seksual.

Karakteristik klinis sampel penelitian dengan kariotip normal berdasarkan *Quigley stage* bervariasi dari *stage* 1 sampai dengan 6, dengan karakteristik terbanyak pada *stage* 3. Sampel dengan aberasi numerik memiliki karakteristik klinik sesuai *Quigley stage* 1 dan sampel dengan aberasi struktur pada *stage* 3. Karakteristik klinis sampel dengan aberasi struktur yang termasuk *Quigley stage* 3 ini, menunjukkan bahwa fenotip sampel ini tidak berbeda jauh dengan sampel lainnya. Hal ini bisa diperkirakan karena bagian kromosom Y yang berperan dalam diferensiasi seksual dan secara tidak langsung mempengaruhi fenotip genitalia eksterna adalah pada lengan pendek kromosom Y yang mengandung gen SRY sedangkan segmen yang mengalami duplikasi dan kemungkinan mengalami delesi akibat duplikasi ini adalah bagian lengan panjang dari 2 kromosom Y.

Kemungkinan-kemungkinan fenotip pada kasus dengan aberasi struktur kromosom Y dari berbagai literatur, menunjukkan bahwa fenotip pada kasus ini dapat bervariasi. Oleh karena itu pada kasus dengan aberasi struktur kromosom Y perlu pemeriksaan fisik yang lebih lengkap, pemeriksaan sitogenetik dan pemeriksaan secara molekuler.

Panjang rata-rata kromosom Y sampel adalah 2,43 μm (SD: 0,35) dan pada kontrol adalah 2,54 (SD: 0,31) dengan hasil tes statistik yang menunjukkan panjang kromosom Y antara sampel dan kontrol ini tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Sampel dengan aberasi struktur memiliki panjang kromosom Y yang lebih dari yang lain, dapat dipahami bahwa panjangnya kromosom ini akibat adanya duplikasi 2 kromosom Y yang hampir utuh. Hasil ini dapat menunjukkan

bahwa panjang kromosom Y tidak berpengaruh terhadap fenotip penderita ambigu genitalia.

Berdasarkan penelitian terdahulu, telah diketahui bahwa ukuran panjang kromosom Y berbeda di antara berbagai populasi, sedangkan sampel dalam penelitian ini tidak ditentukan secara khusus berdasarkan suku atau populasinya, hanya mewakili populasi dengan ambigu genitalia. Ukuran panjang kromosom Y antara sampel dengan kontrol orang normal yang tidak berbeda bermakna ini tidak menyingkirkan kemungkinan adanya mutasi genetik yang menyebabkan terjadinya fenotip yang berbeda. Hal ini sekaligus menekankan pentingnya pemeriksaan molekuler untuk mengetahui adanya mutasi genetik.

Hasil penelitian ini menunjukkan pentingnya pemeriksaan sitogenetik pada penderita ambigu genitalia, tetapi adanya abnormalitas kromosom Y berupa aberasi struktur dan panjang kromosom Y tidak secara langsung berpengaruh terhadap fenotip penderita.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hughes I.A. 2002. *Intersex. BJU International* 1990: 769-776
2. Faradz SMH. Sexual Ambiguity in Semarang, *a Cytogenetic Approach. In : Proceedings of the National seminar and Workshop on Ambiguous Genitalia*. Semarang, Indonesia, 2004 : 4
3. Stuart ALO and Brain C E. *Early assessment of ambiguous genitalia. Arch Dis Child* 2004 ; 89: 401-407
4. Susanto R. Profil Hormonal pada Anak dengan Ambigus Genitalia. *In: Proceedings of the National seminar and Workshop on Ambiguous Genitalia*, Semarang, Indonesia, 2004 : 46-76
5. Maharaj NR, Dhair A, Wiersma R, and Moodley. *Intersex condition in children and adolescents; surgical, ethical and legal considerations. J Pediatr Adolesc Gynecol* 2005;18: 399–402
6. Göllü G, Yildiz RV, Bingöl KM, Yagmurlu A, Senyu cel, Tanju A, Go kcora H, Dindar H. *Ambiguous Genitalia: An Overview of 17 years Experience. jped Surg* 2007; 42: 840-844
7. MacLaughlin DT and Donahoe PK. *Sex Determination and Differentiation. Review article in N Engl J Med* 2004; 350:367-378
8. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola and Foresta. *The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. J Med Genet* 2003; 40: 18-24
9. Quilter CR, Nathwani N, Conway GS, Stanhope R, Ralph D, Bahadur, et al. *A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. J Med Genet* 2002; 39: 80-86
10. Aktas D, Alikasifoglu M, Gonc N, Senocak ME, Tuncbilek E. *Isodicentric Y (p11.32) chromosome in an infant with mixed gonadal dysgenesis. J.ejmg.* 2006; 49 : 141–149
11. Liow SL, Yong EL, and Ng SC. *Prognostic value of Y Deletion Analysis. Hum. Reprod.* 2001; 16 (1): 9-12.

12. Siffroi JP, Bourhis CL, Krausz C, Barbaux S, Murci LQ, Kanafani S, et al . *Sex Chromosome Mosaicism in Males Carrying Y Chromosome Long Arm Deletion. Hum. Reprod.* 2000; 15 (12): 2559-2562
13. Sankar VH, Phadke R Shuba. *Ring Chromosome 13 in an Infant with Ambiguous Genitalia. Indian Ped* 2006; 43.
14. Thangaraj K, Subramanian S, Reddy AG, Singh L. *Unique Case of Deletion and Duplication in the Long Arm of the Y Chromosome in an Individual With Ambiguous Genitalia. Research Letter in Am J Med Gen* 2003;116A: 205–207
15. Liou JD, Ma YY, Gibson LH, Hua Su, Charest N, Lau Yun-Fai C, and Yang-Feng TL. *Cytogenetic and molecular studies of a familial paracentric inversion of Y chromosome present in a patient with ambiguous genitalia. Am J Med Gen* 1998; 70 (2): 134-137
16. DesGroseilliers M, Bergeron MB, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. *Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases. Short Report on Clin Gen* 2006; 70 (2): 145-150
17. Dundar M, Gordon L, Hasan A, Kurtoglu S, Demiryilmaz F, and Kucukaydin M. *A case of ambiguous genitalia presenting with a 45,X/46,Xr(Y)(p11.2;q11.23)/ 47,X,idic(Y)(p11.2), idic(Y)(p11.2) karyotype. Ann Gén* 2001; 44 :5–8
18. Smith YR, Stetten G, Charity L, Isacson C, Gearhart, And Namnoum AB. *Ambiguous Genitalia in an Elderly Woman With A Mosaic 45,X/46,X,DICM(Q 11.2) Karyotype. A Case Report in Urology* 1996; 47: 259-262.
19. Mundhofir FEP, Winarni TI, Juniarto AZ, Faradz SMH. *Ring Chromosome Y in a boy with genital anomaly, a case report Publish in PAAI, Semarang* 2006
20. Bruyere, Speevak, Winsor, Fréminville, Farrell, Gowan-Jordan, et al. *Isodicentric Yp: prenatal diagnosis and outcome in 12 cases. Prenat Diagn* 2006; 26: 324-329
21. Winarni TI, Juniarto AZ, Faradz SMH, Hamel B. *Chromosomal Finding Among Female with Amenorhe Primer. Presented in Joint 7th Human Genome Organization Asian pacific Meeting and The 8th Asian pacific Conference on Human Genetic, Philipines April 2-5th 2008*

22. Jobling MA and Smith CT. *The Human Y Chromosome: An Evolution marker Comes of Age. Review Article in Nature* 2003; available on www.nature.com
23. Barch MJ. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincot-Raven Publisher, Philadelphia, New York 1991; 10-11; 180-183
24. Passarge E. *Color Atlas of Genetics 3rd Edition*. Thieme Stuttgart, New York 2007: 200-204
25. Barbosa AAL, Cavalli IJ, Abel K, Santos M and Azevêdo ES. *Family names and the length of the Y chromosome in Brazilian blacks. Braz. J. Genet* 1997; vol. 20(1)
26. Simoni M, Bakker E, and Karausz C. *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions State of the art 2004. Intl journal of androl* 2004; 27: 240-249
27. Hughes I.A. *Ambiguous Genitalia dalam Brook C.G.D, Clayton P.E, Brown R.S. (ed). Clinical Pediatric Endocrinology 5th ed. Blackwell Publihing, Victoria* 2005 : 171-182
28. Boehmer ALM. *Familial Disorder of sexual Differentiation; a clinical and molecular genetic evaluation* 2000: 3-30
29. Rittler Monica and Castilla E.E. *Endocrine Disruptor and Congenital Anomalies. Cad. Saude Publika, Rio de Janeiro* 2002; 18(2): 421-428
30. Sadler TW. *Langman's Medical Embriology. 9th ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins* 2000: 319-339
31. Mueller RF and Young ID. *Emery's Elements of Medical genetics. Churchill Livingstone, Edinburgh* 2001: 256
32. Berkovitz GD, Seeherunvong T. *Abnormalities of gonadal differentiation. Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* 1998; 12 (1) : 133-142
33. Quigley CA, Bellis AD, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. *Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives. Endo Jnls* 1995; 16(3): 12
34. Kim S, Jung S, Kim H. *Chromosome Abnormalities in a referred Population for Suspected Chromosomal Aberrations: A Report of 4117 Cases. J Korean Med Sci* 1999; 14: 373-376

35. Telvi L, Lebbar A, Pino OD, Barbet JP and Louis J. *45,X/46,XY Mosaicism: Report of 27 Cases. Peds* 1999; 104: 304-308
36. Velissariou V, Antoniadis T, Patsalis P, Christopoulou S, Hatzipoulou A, Jackie Donoghue, et al. *Prenatal diagnosis of two rare de novo structural aberrations of Y chromosome: cytogenetic and molecular analysis. Prenat Diagn* 2001; 21 :484-487
37. Faradz SMH. Pengantar Sitogenetika, Genetika Molekuler, dan Alat bantu Konseling Genetika. Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP. 2002
38. Schinzel A. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. 2nd Ed. de Gruyter New York*, 2001.p. 924-941
39. Gardner, McKinlay RJ, Sutherland, Grant R. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling , 3rd Edition Oxford University Press*, 2004. p. 265-273
40. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, et al. Deletions of the Homeobox SHOX (Short Stature Homeobox) Are an Important Cause of Growth Failure in Children with Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(3) : 1402-14
41. Rappold GA, Blum WF, Shavrikova P, et al. Genotypes and Phenotypes in Children with Short Stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007; 44: 306-313
42. Yusuf I. Konseling Pra dan Pasca Tindakan Penyesuaian Kelamin. In: *Proceedings of the National Seminar and Workshop on Ambiguous Genitalia*, Semarang, Indonesia : 27-31
43. Firth HV, Hurst JA. Oxford desk Reference Clinical Genetics. In: Hall JG, editor. New York: Oxford University Press, 2005. p. 496-563
44. Visoock J, Aylstock M and Graham JM. *Klinefelter Syndrome and Its Variants: An Update and Review for the Primary Pediatrician. Clin Pediatr (Phila)* 2001; 40; 639
45. Akkari Y, Lawee H, Kelson S, Smith C, Davis C, Boyd L, et al. *Y chromosome heterochromatin of differing lengths in two cell populations of same individual. Prenat Diagn* 2005; 25: 304-306.

Lampiran 1.

Prosedur Pemeriksaan Sitogenetik

1. Preparasi Kromosom

- Bahan yang digunakan yaitu :

darah penderita 5 cc dalam heparin, media MEM, PHA, FBS, colcemid, thymidin, KCL 0.075M, larutan carnoy's.

- Peralatan yang digunakan yaitu :

sprit, tabung Heparin, tabung falcon 10cc, laminary flow, inkubator, pipet endroff, tip pipet, centrifuge, waterbath, pipet ukur, deck glass, mikroskop cahaya.

- Cara kerja : 5 tetes 'buffy coat' dan 5 tetes darah dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 2 media yang berbeda (TC199 dan MEM) yang mengandung 10% FBS dan 100 μ L PHA-P. Kemudian kedua tabung diinkubasi pada suhu 37° C selama 72-96 jam dengan sudut kemiringan tabung ~ 45° di dalam inkubator. Sehari sebelum pemanenan, pada masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes ethidium bromide 10mg/mL. Selanjutnya dilakukan pemanenan dengan meneteskan 3 tetes colcemid pada setiap tabung, kemudian inkubasi diteruskan selama 30 menit. Setelah itu dipusingkan selama 10 menit pada 1000 RPM. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian endapan (pelet) diresuspensikan dan ditambah larutan hipotonik hangat KCL 0,075 M, diresuspensikan lagi

sampai homogen dan diinkubasi 37° C dalam waterbath selama 15-30 menit. Berikutnya tabung-tabung dipusingkan 1000 RPM selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan 5ml larutan fiksasi Carnoy's pelan-pelan melalui dinding tabung, kemudian dikocok. Pemberian larutan fiksasi ini diulangi sebanyak 3 kali sampai didapatkan presipitat yang jernih. Residu yang terbentuk disuspensikan dengan larutan Carnoy's secukupnya sesuai dengan banyaknya pelet. Kemudian disebarakan pada gelas objek dengan meneteskan 2 tetes suspensi pada lokasi yang berbeda.

2. *GTG banding (G-banding)*

Pengecatan ini menggunakan reagen sebagai berikut :

- H₂O₂ 30%
- Larutan Trypsin 1% stok dalam buffer Hanks
- Larutan buffer Hanks (HBSS) pH 6,8-7,2
- Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6,8

Pengecatan Trypsin dilakukan tanpa penghangatan yaitu setelah membiarkan slide menjadi tua lebih kurang selama 3 – 5 hari kemudian dicelupkan ke dalam larutan trypsin 0,1% (yang dilarutkan dengan PBS pH 6,8) selama sekitar 10-20 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir selanjutnya dimasukkan ke dalam staining jar yang berisi cat Giemsa 10% dalam phosphate buffer selama 4-10 menit. Setelah dicat, slide dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan, kemudian siap dianalisa di bawah mikroskop.

3. *CBG Banding (C-banding)*

Pengecatan ini menggunakan reagen berikut:

- 0,2 N HCl
- 5% Ba(OH)₂ ; 5 g Ba(OH)₂ dalam 100mL aqua bidest
- 2 x SSC (0.3M sodium klorid, 0.03 M sodium sitrat, pH 7.0): 17.53 g NaCL dan 8.82 sodium sitrat dalam 1 L aqua bidest
- Cat Giemsa 2% dalam buffer fosfat pH 6.8

Slide yang telah dituakan, dicuci di bawah air mengalir. Kemudian dimasukkan ke dalam wadah berisi 50 mL Ba(OH)₂ 5% yang dihangatkan dalam water bath 50° C, selama beberapa detik. Setelah dicuci di bawah air mengalir, slide dimasukkan ke dalam SSC selama 1 jam, kemudian dicuci kembali dengan air mengalir. Selanjutnya, dimasukkan ke dalam staining jar yang berisi cat Giemsa selama 4 – 10 menit.³⁷

Lampiran 2.

Hasil Preliminary Study Panjang Kromosom Y pada 20 orang laki-laki bukan penderita ambigu genitalia

| No. | Kode Sampel | <i>Banding Level Kariotipe</i> | Panjang kromosom Y (μ m) menurut program leica CW4000 |
|--------------|-------------|--|--|
| 1. | Y31 | 586 | 3,16 |
| 2. | Y15 | 574 | 4,32 |
| 3. | Y14 | 557 | 2,53 |
| 4. | N10 | 580 | 2,84 |
| 5. | N36 | 555 | 2,74 |
| 6. | Y3 | 574 | 3,16 |
| 7. | L | 589 | 2,95 |
| 8. | KG82 | 572 | 3,58 |
| 9. | N41 | 581 | 2,74 |
| 10. | N2 | 555 | 2,74 |
| 11. | PI02 | 559 | 3,26 |
| 12. | KG20 | 561 | 2,53 |
| 13. | N37 | 604 | 2,74 |
| 14. | KG15 | 571 | 2,74 |
| 15. | KG9 | 562 | 3,26 |
| 16. | KG12 | 552 | 2,95 |
| 17. | KG13 | 591 | 3,19 |
| 18. | KG17 | 590 | 2,42 |
| 19. | KG19 | 562 | 3,05 |
| 20 | KG4 | 554 | 2,00 |
| Minimum | | | 2,00 |
| Maximum | | | 4,32 |
| Rerata | | | 2,88 |
| Simpang baku | | | 0,53 |

Lampiran 3.

Hasil Tes Statistik perbedaan Panjang Kromosom Y antara Subyek dan Kontrol Penelitian

Descriptives

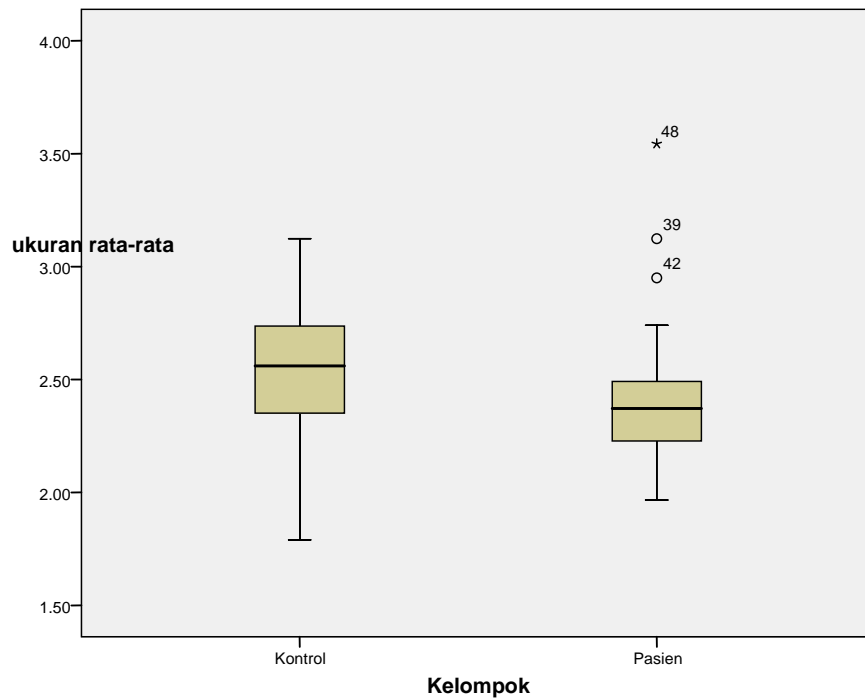
| Kelompok | | | | Statistic | Std. Error |
|------------------|---------|----------------------------------|-------------|-----------|------------|
| ukuran rata-rata | Kontrol | Mean | | 2.5454 | .06360 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 2.4138 | |
| | | | Upper Bound | 2.6770 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 2.5536 | |
| | | Median | | 2.5600 | |
| | | Variance | | .097 | |
| | | Std. Deviation | | .31158 | |
| | | Minimum | | 1.79 | |
| | | Maximum | | 3.12 | |
| | | Range | | 1.33 | |
| | | Interquartile Range | | .39 | |
| | | Skewness | | -.315 | |
| | | Kurtosis | | .406 | |
| | Pasien | Mean | | 2.4324 | .07329 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 2.2807 | |
| | | | Upper Bound | 2.5840 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 2.4001 | |
| | | Median | | 2.3717 | |
| | | Variance | | .129 | |
| | | Std. Deviation | | .35905 | |
| | | Minimum | | 1.97 | |
| | | Maximum | | 3.54 | |
| | | Range | | 1.58 | |
| | | Interquartile Range | | .27 | |
| | | Skewness | | 1.597 | |
| | | Kurtosis | | 3.210 | |

Tests of Normality

| Kelompok | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------------|---------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| ukuran rata-rata | Kontrol | .065 | 24 | .200* | .986 | 24 | .974 |
| | Pasien | .224 | 24 | .003 | .859 | 24 | .003 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|------------------|----------|----|-----------|--------------|
| ukuran rata-rata | Kontrol | 24 | 28.19 | 676.50 |
| | Pasien | 24 | 20.81 | 499.50 |
| | Total | 48 | | |

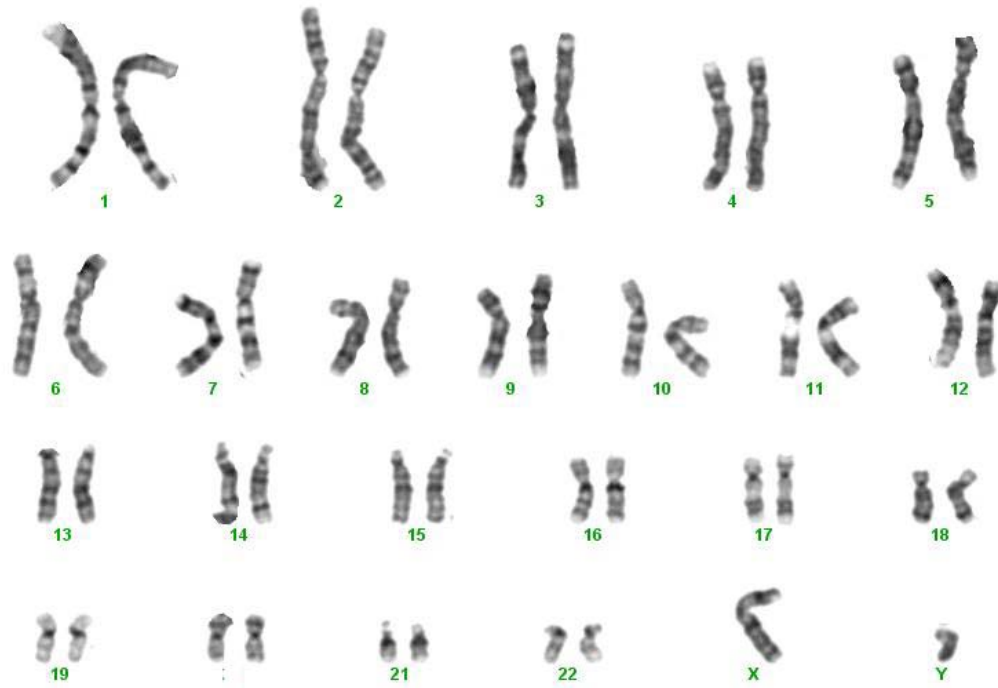
Test Statistics^a

| | ukuran rata-rata |
|------------------------|------------------|
| Mann-Whitney U | 199.500 |
| Wilcoxon W | 499.500 |
| Z | -1.826 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .068 |

a. Grouping Variable: Kelompok

Lampiran 4.

Contoh kariotip dari metafase yang memenuhi kriteria banding level 550



Lampiran 5. Ethical Clearence

Lampiran 6. *Informed Consent*

